

Maestría en Ciencias e Ingeniería de Materiales

MODIFICACIÓN DE LA SUPERFICIE DE UN ELECTRODO
SELECTIVO A ACETILCOLINA CON MATERIALES
NANOESTRUCTURADOS PARA LA DETECCIÓN DE
PESTICIDAS EN UN SISTEMA BIO-ELECTROQUÍMICO

Tesis que presenta

Crystal de Rosa García Díaz

Para obtener el grado de

Maestra en Ciencias e Ingeniería de Materiales

Asesora Interna

Dra. Silvia Corona Avendaño

Asesora Externa

Dra. María Teresa Ramírez Silva. UAM-Iztapalapa

*A mis abuelitos:
Mami, Papi, Chayito y Toño
de ustedes viene la fuerza
que nos impulsa a evolucionar.*



AGRADECIMIENTOS

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT) por la beca (723693) otorgada para llevar a cabo mis estudios de maestría. La Dra. María Teresa Ramírez Silva agradece a CONACyT por el proyecto 237327, y al proyecto de Cátedra CONACyT 2159.

A la UAM-Azcapotzalco por darme la oportunidad realizar mis estudios de posgrado, en especial a los profesores del Área de Ingeniería de Materiales por sus aportaciones y conocimientos compartidos, así como por brindarme un espacio en el Laboratorio Interdisciplinario de Electroquímica e Ingeniería de Materiales para la realización de este trabajo.

Al Área de Química Analítica de la UAM-Iztapalapa por abrirme las puertas de su laboratorio para la llevar a cabo parte importante de la experimentación de este trabajo.

A mis asesoras Dra. Silvia Corona Avendaño y Dra. Ma. Teresa Ramírez Silva por su enorme paciencia y apoyo. Por compartir sus conocimientos, ustedes son un ejemplo a seguir y las admiro.

A mis sinodales, el Dr. Jorge Juárez Gómez por el tiempo y dedicación para enseñarme y compartir sus conocimientos sin los cuales este trabajo no se hubiera llevado a cabo, a la Dra. Dafne Sarahia Guzmán por su disposición y constante apoyo en todo momento y al Dr. Mario Romero Romo por su interés y sabios consejos para el desarrollo de este proyecto.

A mis compañeros y amigos de laboratorio y de generación, Yessi, Alejandrina, Ivonne, Iris, Ede, Nohemi, Karina, Mariana, Selene, Regino, Manuel, Iván, Giovanni, Alejandro, Fernando, Julio V, Julio A., Manuel, Gloria, Gina, Gabriel, Marcos, Ross y Botello, quienes formaron parte importante de este camino de formación, gracias por todos los lindos momentos compartidos.

A mis hermanas de vida Sol, Paty, Ely y Yessi porque están en cada momento bueno o malo, con su apoyo incondicional. A Julio G. por acompañarme en este camino durante muchos años.

A mi Familia, en especial a mis Papás Rosa y Toño porque a pesar de todo siempre creyeron en mí, incluso cuando yo dudaba. A mis Hermanas Carmen y Ely, sin ellas no hubiera logrado llegar hasta aquí pues han sido mi ejemplo más cercano, mi soporte y mi fortaleza. A mis sobrinos Francisco, Ricardo y mi chiquita Yaretzi por todas las risas y momentos de diversión, ustedes me recuerdan el valor de la vida y los sueños por cumplir, son mi motivación para seguir adelante.

A mis maestros Juan, Jivan y Gaby quienes me enseñaron a ver la luz en todos y cada uno de los procesos que viví en esta etapa.

A Dios porque en este camino aprendí mucho en todos los aspectos y principalmente porque me permitió compartir este proceso con personas hermosas.

ÍNDICE

AGRADECIMIENTOS	2
ÍNDICE	4
ÍNDICE DE FIGURAS	6
ÍNDICE DE TABLAS	10
ACRÓNIMOS.....	12
RESUMEN.....	16
ABSTRACT	17
INTRODUCCIÓN.....	18
HIPÓTESIS	20
OBJETIVO GENERAL	21
OBJETIVOS PARTICULARES	21
CAPÍTULO 1.....	22
GENERALIDADES: PESTICIDAS Y ENZIMAS.....	22
1.1 PESTICIDAS Y SU USO.....	22
1.2 CLASIFICACIÓN DE LOS PESTICIDAS.....	23
1.3 IMPACTO EN LA SALUD.	26
1.4 DETECCIÓN DE LOS PESTICIDAS.	27
LAS ENZIMAS: CATALIZADORES BIOLÓGICOS Y SU INHIBICIÓN	29
1.5 LA FUNCIÓN DE LAS ENZIMAS.....	29
1.6 INHIBICIÓN ENZIMÁTICA.	30
CAPÍTULO 2.....	31
CONSTRUCCIÓN DE UN ISE SELECTIVO A IONES DE ACETILCOLINA.....	31
2.1. MECANISMO DE RESPUESTA DE UN ISE.....	31
2.2. MEMBRANA POLIMÉRICA.....	31
2.3. LÍMITE DE DETECCIÓN (LD) EN LOS ISE	33
METODOLOGÍA	34
2.4. ANÁLISIS DE LA SELECTIVIDAD DEL ISE A LA ACETILCOLINA CON DIFERENTES PLASTIFICANTES.	34
2.5. INTERFERENCIAS.....	38
2.6. RESPUESTA DEL ISE A DIFERENTES CATIONES.....	40

2.7. OPTIMIZACIÓN DE LOS COMPONENTES DE LA MEMBRANA SELECTIVA	44
CAPÍTULO 3.....	48
SÍNTESIS DE LAS NANOPARTÍCULAS DE ORO Y MODIFICACIÓN DEL ELECTRODO SELECTIVO A IONES ACETILCOLINA	48
3.1 NANOPARTÍCULAS DE ORO (NPsAu).	48
3.2 SÍNTESIS DE LAS NPsAu.	48
3.3. COMPARACIÓN DE LA RESPUESTA POTENCIOMÉTRICA UTILIZANDO ELECTRODOS SERIGRAFIADOS Y ELECTRODOS TIPO COMPOSITE.....	49
3.4. RESPUESTA DEL ISE ANTE EL TAMAÑO DE LOS CATIONES.	54
3.5. OPTIMIZACIÓN DEL TIEMPO DE ACONDICIONAMIENTO DEL ELECTRODO.	58
3.6 RESPUESTA DEL ISE VARIANDO EL PORCENTAJE EN PESO DE LAS NPsAu.	67
CAPÍTULO 4.....	72
MECANISMO DE REACCIÓN Y CINÉTICA DE LA ACETILCOLINESTERASA.....	72
4.1. LA ACETILCOLINAESTERASA.	72
4.2. VELOCIDAD DE REACCIÓN ENZIMÁTICA.	74
4.3 CINÉTICA DE LA REACCIÓN DE LA AChE CON EL ISE.....	76
CAPÍTULO 5.....	78
DETERMINACIÓN DE PESTICIDAS CARBAMATADOS UTILIZANDO UN ISE DE ACETILCOLINA.....	78
5.1 MECANISMO DE INHIBICIÓN DE LA AChE EN PRESENCIA DEL PROPOXUR.	78
5.2 DETERMINACIÓN ELECTROQUÍMICA DE LA PRESENCIA DE PROPOXUR EN EL SISTEMA BIO-ELECTROQUÍMICO.....	79
CONCLUSIONES GENRALES.....	82
PERSPECTIVAS	83
ANEXOS.....	84
ANEXO 1.....	84
POTENCIOMETRÍA.	84
SENSORES POTENCIOMÉTRICOS	85
ANEXO 2.....	87
TIPOS DE ELECTRODOS	87
ELECTRODOS SERIGRAFIADOS.....	88
ELECTRODOS TIPO COMPOSITE.....	89
REFERENCIAS	90

ÍNDICE DE FIGURAS

INTRODUCCIÓN

Figura I.1. *Estructura química del cloruro de acetilcolina [11].*

CAPÍTULO 1

Figura 1.1 *Estructura química del Propoxur.*

Figura 1.2. *Esquema que representa la interacción del sitio activo de una enzima con el sustrato.*

Figura 1.3. *Esquema que representa la inhibición de una enzima, tanto con el sustrato como con el inhibidor y la forma en que se ajustan al sitio activo de la enzima.*

CAPÍTULO 2

Figura 2.1. *Componentes de una membrana polimérica: a) Matriz (PVC), b) Ionóforo (tetrafenil borato de Sodio) y c) Plastificante (2-Nitrofenil pentil éter).*

Figura 2.2. *Gráfica representativa de las zonas que componen a una curva de potenciometría y la obtención del límite de detección.*

Figura 2.3. *Curvas de calibración de $[ACh^+]$ para a) electrodo con plastificante DBBP, b) electrodo con plastificante NPE, c) electrodo con plastificante Sebacato y d) electrodo con plastificante ADIPATO.*

Figura 2.4. *Curvas de calibración de ACh^+ para el electrodo con plastificante NPOE en donde los puntos morados representan el primer estudio y los rosas y verdes el segundo y tercer estudio potenciométrico respectivamente.*

Figura 2.5. *Gráfico de potenciometría de un ion primario (puntos morados) y su ion interferente (puntos azules).*

Figura 2.6. *Curvas de calibración para los iones interferentes (Ch^+ , H^+ , K^+ , Na^+) con respecto a la ACh^+ donde $[I]$ representa la concentración de cada ion.*

Figura 2.7. *Curvas de calibración para la ACh^+ y sus iones interferentes (a) Con un electrodo con membrana compuesta por PVC al 33.2%, NPE al 62% y KTPB al 5%. (b). Con un electrodo con membrana compuesta por PVC al 33.2%, NPE al 66.3% y KTPB al 0.5%.*

Figura 2.8. *Curva de calibración para la ACh⁺ y sus iones interferentes (a) Con un electrodo con membrana compuesta por PVC al 33%, NPE al 62% y NaTPB al 5%. (b). Con un electrodo con membrana compuesta por PVC al 33.2%, NPE al 66.3% y NaTPB al 0.5%.*

CAPÍTULO 3

Figura 3.1. *Solución coloidal con de NPsAu.*

Figura 3.2. *Filtrado de las NPsAu soportadas en carbón vulcan XC-72R.*

Figura 3.3. *Esquema de la construcción de la parte interna del electrodo composite.*

Figura 3.4. *Curva de calibración para la ACh⁺, en a) los electrodos serigrafiados, en rosa se observa el electrodo sin modificar y en amarillo un electrodo modificado con NPsAu y en b) los electrodos composite, en negro sin modificar y en morado el modificado con NPsAu.*

Figura 3.5. *Curva de calibración para los electrodos serigrafiados y los electrodos tipo composite, (I) muestra la respuesta ante el catión interferente Ch⁺, (II) para el interferente Na⁺, (III) para el interferente K⁺ y (IV) para el interferente H⁺.*

Figura 3.6. *a) Curva de calibración para la ACh⁺ y sus iones interferentes, b) Muestra la zona de linealidad para la ACh⁺ y sus iones interferentes utilizando un electrodo sin NPsAu acondicionado durante 30 minutos, la tabla muestra sus parámetros analíticos.*

Figura 3.7. *a) Curva de calibración para la ACh⁺ y sus iones interferentes, b) Muestra la zona de linealidad para la ACh⁺ y sus iones interferentes con un electrodo con NPsAu acondicionado durante 30 minutos, la tabla muestra sus parámetros analíticos.*

Figura 3.8. *Curva de calibración para el electrodo 1 sin acondicionar y como analito ACh⁺.*

Figura 3.9. *Curva de calibración para el electrodo 2 acondicionado durante 5 minutos.*

Figura 3.10. *Curva de calibración para el electrodo 3 acondicionado durante 10 minutos.*

Figura 3.11. *Curva de calibración para el electrodo 4 acondicionado durante 15 minutos.*

Figura 3.12. *Curva de calibración para el electrodo 5 acondicionado durante 20 minutos.*

Figura 3.13. *Curva de calibración para el electrodo 6 acondicionado durante 30 minutos.*

Figura 3.14. Curva de calibración para la ACh⁺ y Ch⁺ con un electrodo modificado con NPsAu al 1% en peso y una membrana compuesta por PVC al 33.2% como matriz, NPE al 0.5% como plastificante y NaTPB al 66.3% como ionóforo.

Figura 3.15. Curva de calibración para la ACh⁺ y Ch⁺ con un electrodo modificado con NPsAu al 5% en peso y una membrana compuesta por PVC al 33.2% como matriz, NPE al 0.5% como plastificante y NaTPB al 66.3% como ionóforo.

Figura 3.16. Curva de calibración para la ACh⁺ y Ch⁺ con un electrodo modificado con NPsAu al 10% en peso y una membrana compuesta por PVC al 33.2% como matriz, NPE al 0.5% como plastificante y NaTPB al 66.3% como ionóforo

CAPÍTULO 4

Figura 4.1. Reacción de hidrólisis de la ACh catalizada por la AChE.

Figura 4.2. a) Vista esquemática de la garganta del sitio activo de la AChE. b) Modelo de ACh unido en el sitio activo de AChE [33].

Figura 4.3. Representación gráfica del mecanismo de reacción de la ACh con la AChE.

Figura 4.4. Esquema de saturación de la enzima debido al aumento en la concentración de sustrato.

Figura 4.5. Representación gráfica de la velocidad de una reacción enzimática donde se puede observar los parámetros básicos de la ecuación de Michaelis-Menten.

Figura 4.6. Gráfica de potencial versus tiempo donde se observa la acción de la AChE en el sistema.

CAPÍTULO 5

Figura 5.1. Representación gráfica del mecanismo de inhibición de la AChE en presencia del pesticida Propoxur.

Figura 5.2. Gráfica de potencial versus tiempo donde se observa en verde la reacción de la AChE en presencia de la ACh y en azul la inhibición del Propoxur ante la AChE dentro del sistema bio-electroquímico.

ANEXOS

Figura A.1. *Representación esquemática de la respuesta típica de una potenciometría de un ISE.*

Figura A.2. *Esquema de la composición de un electrodo Screen-Printed.*

Figura A.3. *Esquema de la construcción de un electrodo tipo composite.*

ÍNDICE DE TABLAS

CAPÍTULO 1

Tabla 1.1. *Clasificación de los pesticidas de acuerdo a su estructura química.*

CAPÍTULO 2

Tabla 2.1. *Plastificante utilizado de acuerdo a la membrana.*

Tabla 2.2. *Parámetros analíticos de los diferentes electrodos construidos.*

Tabla 2.3. *Valores de la pendiente y el coeficiente de selectividad para el ion interferente principal Ch^+ .*

Tabla 2.4. *Valores de los coeficientes de selectividad de los iones interferentes para cada electrodo.*

Tabla 2.5. *Componentes en porciento peso de la membrana polimérica para cada electrodo.*

Tabla 2.6. *Muestra los valores de los parámetros analíticos para cada electrodo e interferentes dependiendo de la membrana utilizada.*

Tabla 2.6. (Bis). *Muestra los valores de los parámetros analíticos para el electrodo 4, de la ACh^+ y su interferente Ch^+ .*

CAPÍTULO 3

Tabla 3.1. *Valores de las pendiente en mV/décadas para cada ion y tipo de electrodo sin modificar.*

Tabla 3.2 *Resultados de los parámetros analíticos para cada electrodo e interferentes.*

Tabla 3.3. *Constantes de interferencia de los iones para cada electrodo.*

Tabla 3.4 *Tiempos de acondicionamiento para cada electrodo.*

Tabla 3.5. *Muestra los valores de los parámetros analíticos para el electrodo 1.*

Tabla 3.6. *Muestra los valores de los parámetros analíticos para el electrodo 2.*

Tabla 3.7. *Muestra los valores de los parámetros analíticos para el electrodo 3.*

Tabla 3.8. *Muestra los valores de los parámetros analíticos para el electrodo 4.*

Tabla 3.9. *Muestra los valores de los parámetros analíticos para el electrodo 5.*

Tabla 3.10 *Muestra los valores de los parámetros analíticos para el electrodo 6.*

Tabla 3.11 *Muestra el valor del promedio de los parámetros analíticos para cada electrodo.*

Tabla 3.12. *Porcentaje en peso de NPsAu añadidas a la mezcla.*

Tabla 3.13. *Muestra los valores de los parámetros analíticos para el electrodo modificado con NPsAu al 1% en peso.*

Tabla 3.14. *Muestra los valores de los parámetros analíticos para el electrodo modificado con NPsAu al 5% en peso.*

Tabla 3.15. *Muestra los valores de los parámetros analíticos para el electrodo modificado con NPsAu al 10% en peso.*

ACRÓNIMOS

ACh	Acetilcolina
ACh ⁺	Catión de Acetilcolina
AChE	Acetilcolinesterasa
ADIPATO	Adipato de bis (1-butylpenty)
Ag/Ag _{sat}	Electrodo de Plata/Cloruro de Plata saturado
a _i	Actividad del ion
a _i	Actividad de ion interferente
Ch	Cloruro de Colina
Ch ⁺	Catión Colina
°C	Grados Celcius
cm	centímetros
DDT	Dicloro difenil tricoloroetano
DBBP	Dibutil butilfosfonato
E _{const}	Potencial a condiciones constantes
E _i	Potencial del ion principal
E _{int}	Potencial del ion interferente
E _j	Potencial de unión líquida

E_M	Potencial de Membrana
EPA	United States Environmental Protection Agency
E_{PB}	Potencial límite en la interfase membrana/muestra
ES	Enzima-Sustrato
E°	Potencial estandar
F	Constante de Faraday
FAO	Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura
H^+	Protón
$HAuCl_4$	Ácido tetracloroáurico
Hg	Mercurio
Int.	Ion interferente
ISE	Electrodo selectivo a iones
IUPAC	Unión Internacional de Química Pura y Aplicada
K^+	Catión Potasio
K_m	Constante de Michaelis-Menten
$K_{i,j}^{pot}$	Coeficiente de selectividad potenciométrica
KTPB	Tetrafenil borato de Potasio
LIEIM	Laboratorio Interdisciplinario de Electroquímica e Ingeniería de Materiales

LD	Límite de Detección
M	Molar
m	Pendiente
mg	miligramos
mV	milivolts
mL	Mililitro
Na ⁺	Catión Sódio
Na ₃ C ₃ H ₅ O ₂ .(COO) ₃ Citrato Trisódico	
NaTPB	Tetrafenil borato de sodio
nm	nanómetros
NPE	2-nitrofenil éter de pentilo
NPOE	2-nitrofenil éter de octilo
NPsAu	Nanopartículas de Oro
OMS	Organización de las Naciones Unidas
PVC	Policloruro de vinilo
R	Constante Universal de los Gases
rpm	revoluciones por minuto
RxnE	Reacción Enzimática
S	Sustrato
Sebacato	Bis (2-ethylhexyl) sebacato

T	Temperatura absoluta
THF	Tetrahidrofurano
UAM-A	Universidad Autónoma Metropolitana- Azcapotzalco.
UV	Ultravioleta
v	velocidad
$V_{\text{máx}}$	Velocidad máxima
Z	Valencia de ion
Z_i	Valencia del ion principal
Z_j	Valencia del ion interferente
\emptyset	Potencial eléctrico
μ	Potencial químico
μ^0	Potencial químico en condiciones estándar
μL	microlitros
$\text{M}\Omega$	mega ohm

RESUMEN

En este trabajo se presenta la construcción de un electrodo potenciométrico selectivo a iones de Acetilcolina, el cual demostró ser eficiente en la detección de carbamatados, en específico del Propoxur, dentro de un sistema bio-electroquímico, el cual consta de una solución en la que se encuentra la Acetilcolina, la enzima y el pesticida.

Para la construcción del electrodo, se tomaron en cuenta parámetros como la composición de la membrana polimérica, su selectividad ante diversos cationes y el tiempo de acondicionamiento de la misma.

Además, se modificó el electrodo con Nanopartículas de Oro (NPsAu) con el objetivo de aumentar tanto la sensibilidad del electrodo, como la selectividad ante el ion de interés. Finalmente se realizó la determinación del pesticida mediante la inhibición de la enzima Acetilcolinaesterasa dentro del sistema bio-electroquímico propuesto.

ABSTRACT

The construction of a potentiometric ion selective electrode, which is selective to Acetylcholine ions, is presented in this paper. The detection of carbamated pesticides, specifically Propoxur, within a bio-electrochemical system, which consists of a solution containing Acetylcholine, the enzyme and the pesticide was proved to be efficient.

For this construction, several parameters were taken into account like membrane components, their interactions within different ions and the time of conditioning.

On the other hand, the electrode was modified with Gold Nanoparticles (NPsAu) in order to increase both, the sensitivity of the electrode and the selectivity to the analyte. Finally, the determination of the pesticide was carried out by inhibiting the enzyme Acetylcholine esterase within the proposed bio-electrochemical system.

INTRODUCCIÓN

Los pesticidas son compuestos químicos desarrollados con el propósito de combatir plagas, son ampliamente utilizados en sembradíos y bodegas de almacenamiento de alimentos pero también se encuentran en productos de limpieza para el hogar y para el cuidado e higiene de mascotas y plantas[1], debido a que su uso se ha incrementado considerablemente por el aumento de las plagas, se han generado diversos problemas de contaminación ambiental y efectos potencialmente peligrosos para la salud [2],[3]; los pesticidas carbamatados y organofosforados fueron desarrollados como una alternativa menos tóxica, no obstante a pesar de que su bioacumulación es poca, se ha constatado su potencial peligro para la salud del ser humano debido a que son inhibidores de la acetilcolinesterasa (AChE), su exposición constante provoca efectos a largo plazo que van desde contracciones musculares, convulsiones, depresión respiratoria e hipotensión, hasta arritmias cardíacas fatales, disfunción cerebral severa y muerte por asfixia [4], [5]. Su principal factor de riesgo radica en que al unirse el pesticida con la enzima produce una inhibición en la reacción de hidrólisis del neurotransmisor acetilcolina, irreversible en el caso de los organofosforados y reversible con los carbamatados [6], [7]. El Propoxur es un pesticida perteneciente al grupo de los carbamatados y de uso muy común tanto en la industria como en el sector salud para el control de mosquitos que transmiten enfermedades como la malaria, el dengue y el chikungunya [8].

Lo antes mencionado demuestra la importancia de desarrollar métodos que logren determinar y cuantificar estos compuestos para conseguir una regulación y control de las cantidades presentes en diferentes medios y en tiempos cortos. Algunas de las herramientas más utilizadas con este propósito han sido la cromatografía de gases, cromatografía líquida de alta resolución y espectrofotometría de masas [9], aunque han proporcionado buenos resultados, requieren de personal altamente capacitado, largos tiempos de detección y un pre tratamiento de la muestra, además de que sus costos son elevados; como alternativa para lograr estas determinaciones se han desarrollado métodos electroquímicos, que utilizan sensores y biosensores, [10] los cuales

son confiables y prácticos, además de presentar alta reproducibilidad, sensibilidad y estabilidad; cabe resaltar que son de fácil preparación y las determinaciones son muy rápidas por lo que estos métodos representan un menor costo en comparación con los anteriores [11]. Los biosensores utilizan un elemento de reconocimiento biológico tales como las enzimas, las cuales deben estar sujetas al electrodo mediante su inmovilización.

Debido a la estructura molecular de la ACh (Figura I.2.) ésta puede ser estudiada mediante electrodos de membrana conocidos como electrodos selectivos a iones (ISE), los cuales se basan en la utilización de una membrana selectiva, semipermeable y lipofílica que puede ser polimérica o de vidrio, permitiendo el paso de ciertos iones dependiendo de la composición de la misma[12], [13]. Aunque estos sensores responden primariamente al ion para el cual fueron contruidos ocurre que algunos iones interfieren en el proceso de detección como resultado de una similitud en su estructura molecular y electrónica con el analito. Estos electrodos ofrecen ventajas importantes como: tamaño pequeño, bajo costo, bajo consumo de energía, portabilidad para muestras *in situ* [14], [15]. Además, en este caso particular la determinación se puede hacer en un sistema bio-electroquímico, es decir, sin la necesidad de inmovilizar la enzima.

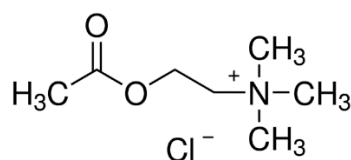


Figura I.1. Estructura química del cloruro de acetilcolina [11].

Por otro lado, los materiales nanoestructurados en el campo de los sensores electroquímicos, han ayudado a diseñar sensores más selectivos y sensibles, en específico cuando estos nanomateriales se combinan con un elemento de reconocimiento biológico y son llamados nanobiosensores, como los son los electrodos fabricados con nanotubos de carbono [16], [17], nanopartículas de oro (NPsAu) y de sulfuro de cadmio, son ejemplos de nanobiosensores, los cuales se han aplicado con éxito en áreas de la medicina para el diagnóstico de cáncer y detección de organismos infecciosos [18].

HIPÓTESIS

Al modificar la superficie de un biosensor potenciométrico con materiales nanoestructurados, mejorará la detección del pesticida Propoxur.

OBJETIVO GENERAL

Optimizar el diseño de un biosensor selectivo a iones de ACh utilizando materiales nanoestructurados para la detección de pesticidas.

OBJETIVOS PARTICULARES

Sintetizar los materiales nanoestructurados.

Construir el electrodo selectivo a iones de ACh.

Modificar con NPsAu el electrodo selectivo a iones de ACh.

Evaluar el biosensor en la determinación de pesticidas.

CAPÍTULO 1

GENERALIDADES: PESTICIDAS Y ENZIMAS

1.1 PESTICIDAS Y SU USO.

Los pesticidas, también conocidos como plaguicidas, son compuestos químicos desarrollados con el propósito de combatir malezas y/o plagas. La Organización Mundial de la Salud (OMS) y la Organización de las Naciones Unidas para la Agricultura y Alimentación (FAO), los han definido como cualquier sustancia o mezcla de sustancias destinadas a la prevención, destrucción o control de plagas. Esta definición incluye cualquier vector que interfiera con la siembra, elaboración, almacenamiento, transporte o comercialización de alimentos, productos agrícolas, madera, forraje, alimentos para animales o bien, aquellas sustancias que pueden ser utilizados en el hogar, en productos de limpieza y en productos para el cuidado de mascotas y plantas[3].

Debido al desarrollo de la población a nivel mundial y a partir de la segunda guerra mundial, el uso de los pesticidas se ha incrementado considerablemente, asimismo aumentaron los problemas de contaminación ambiental y para la salud. Sin embargo, su uso es inminente puesto que, a nivel mundial alrededor del 30% de las cosechas durante el periodo de crecimiento y 10% durante su almacenamiento se ven directamente afectadas por diversas plagas.[1].

Otro sector favorecido por el implemento de pesticidas es el sector salud, dónde el 10% de la producción total son utilizados en la lucha contra epidemias como el tifus, la enfermedad de Chagas, el dengue o la malaria. El resto del porcentaje es aprovechado en otros sectores como el de transporte comercial, en la fabricación de materia prima como papel, cartón y madera,

en edificios públicos, áreas verdes, parques y jardines, con el fin de prevenir infestaciones por plagas, principalmente roedores. Además existe un contacto más directo con los pesticidas al ser utilizados en el hogar en productos de limpieza, cosméticos, shampoo y en productos destinados al cuidado de las mascotas y plantas [1]–[3], [20], [21].

Sin embargo, dado su naturaleza tóxica, es necesario hacer énfasis en los posibles daños que se generan, no sólo en el medio ambiente, ya que existe una exposición tanto directa como indirecta para la salud de los seres humanos debido al consumo de restos de pesticidas en los alimentos y en el agua potable. Si bien los países desarrollados cuentan con controles en la fabricación y uso de pesticidas, esto no siempre sucede en países en desarrollo o sub-desarrollados.

1.2 CLASIFICACIÓN DE LOS PESTICIDAS.

Existen diversas formas de clasificar los pesticidas, desde su naturaleza hasta la plaga sobre la que actúan. La clasificación más adecuada es en función de sus características como lo son su vida media, estructura química, persistencia en el medio ambiente y toxicidad [9], siendo esta última de suma importancia para la OMS, definiendo la peligrosidad como la capacidad del pesticida de producir un daño agudo a la salud, a través de una o múltiples exposiciones [8].

Si bien la toxicidad de estas sustancias es primordial, la clasificación de acuerdo a su estructura química, permite que sean clasificados en cinco grupos como lo muestra la Tabla 1.1; cabe resaltar que los pesticidas organoclorados fueron las primeras sustancias que se desarrollaron, llegando a ser de las más dañinas, es por ello que la mayoría de estos se encuentran prohibidos en la actualidad. Dado que fueron prohibidos los pesticidas organoclorados se fueron desarrollando otras sustancias hasta llegar a las piretinas, estos compuestos ya son sustratos de origen natural lo que les permite ser menos persistentes en el ambiente. No obstante, los efectos a largo plazo de algunos pesticidas como los organofosforados y los carbamatados

aún se encuentran en proceso de investigación, aunque ya existe evidencia de que estas sustancias a pesar de ser poco persistentes en el medio ambiente son responsables de desarrollar enfermedades crónicas en el ser humano [7], [22], [23].

Tabla1.1. *Clasificación de los pesticidas de acuerdo a su estructura química.*

CLASIFICACIÓN	CARACTERÍSTICAS	EJEMPLO
Organoclorados	Debido a su estructura poseen alta estabilidad física y química haciéndolos insolubles en agua, por lo que son considerados persistentes (5 a 30 años de vida media).	DDT LINDANO
Clorofenoxiácidos	Son utilizados como herbicidas desde 1930 y su estructura incluye ácido 2,4-dicloro fenoxiacético, se consideran no persistentes ya que su degradación se da en semanas, pero su exposición constante pueden tener un efecto teratógeno en animales.	PENTACLOROFENOL
Organofosforados	Debido a sus componentes como el fósforo y el azufre son menos persistentes puesto que se degradan de semanas a meses, sin embargo, resultan ser más tóxicos para los mamíferos, incluyendo al ser humano ya que son inhibidores de la enzima acetilcolinesterasa (AChE), incluso algunos de estos fueron utilizados como armas bioquímicas en gases nerviosos para fines militares.	PARATHION
Carbamatados	Se pueden dividir en tres tipos principales: a) tienen en su estructura ésteres del ácido carbónico, b) derivados del ácido tiocarbámico (utilizados como fungicidas) c) carbamatados utilizados como herbicidas, al igual que los organofosforados son poco persistentes en el medio ambiente pero inhibidores de la AChE y su toxicidad es variable.	PROPOXUR CARBARYL
Piretinas	Su obtención viene de la pulverización de la flor de crisantemo, proporcionando un efecto inmediato ya que son neuroactivas pero menos tóxicas y nada persistentes, es por ello que, actualmente son de los pesticidas más aceptados, aunque también inhiben a la AChE.	ALETRÍN PERMETRINA

En este aspecto, la mayoría de los casos de intoxicación que se dan actualmente son causados por los pesticidas organofosforados y carbamatados, los cuales son conocidos como inhibidores de la AChE ya que bloquean los sitios activos de esta enzima.

1.2.1 PESTICIDAS INHIBIDORES DE LA ACETILCOLINESTERASA.

Estas sustancias se desarrollaron a principios del siglo XIX, pero no fue hasta 1932 que sus efectos sobre el sistema nervioso colinérgico de los organismos vivos fueron descubiertos, estos actúan de forma similar tanto en insectos como en los humanos y debido a ello fueron utilizados como agentes neurotóxicos en la Segunda Guerra Mundial [1].

Son sintetizados fácilmente, y se les atribuye una vida media dura de algunos días a algunos meses, por lo que se consideran menos dañinos. Su degradación se lleva a cabo por la oxidación e hidrólisis lo que da productos solubles en agua, sin embargo, su efecto tóxico está relacionado principalmente con su capacidad para unirse al sitio activo de la enzima AChE y, por lo tanto, prevenir la transmisión de impulsos nerviosos generando un deterioro de las funciones nerviosas. Esta inhibición es irreversible en el caso de los pesticidas organofosforados y reversible para los pesticidas carbamatados [21]. Debido al auge a nivel mundial del uso de estas sustancias, en este trabajo se detecta el metilcarbamato de 2-isopropoxifenilo, mejor conocido como Propoxur (Figura 1.1), es un insecticida y acaricida perteneciente a la familia de los carbamatados y considerado como una sustancia peligrosa de acuerdo a la EPA, siendo uno de los pesticidas comerciales más utilizados tanto en la industria de control de plagas como de uso doméstico, este compuesto es un polvo blanco con acción residual de larga duración y es utilizado principalmente en el control de la población de mosquitos responsables de la malaria, el dengue y el chikungunya[8].

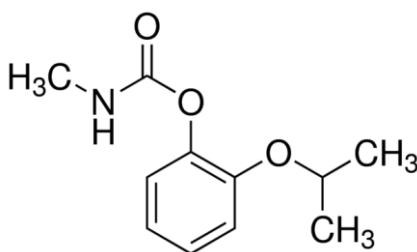


Figura 1.1. Estructura química del Propoxur.

Debido a su naturaleza tóxica, queda claro que los pesticidas no solamente son potencialmente peligrosos para los vectores que se desean controlar, sino también entra en juego la salud de los humanos, he aquí la importancia de conocer sus efectos tanto a corto como a largo plazo, así como las vías principales de exposición a las que estamos expuestos y los síntomas de una posible intoxicación.

1.3 IMPACTO EN LA SALUD.

1.3.1 EXPOSICIÓN DIRECTA E INDIRECTA A LOS PESTICIDAS.

Las personas que se encuentran en contacto regular con ellos deben de ser precavidas y comprender las medidas de seguridad preventivas para reducir el riesgo de una intoxicación [22], [25]. Los trabajadores como los agricultores, fumigadores, empleados de la industria química que los fabrican, transportistas y almacenistas, tanto de su materia prima como del producto terminado, son los que tienen mayor peligro de intoxicación debido al nivel de exposición por contacto continuo con el pesticida [1], [7].

Existen tres principales rutas por la cual entran los pesticidas al cuerpo humano: vía tópica, vía oral y respiratoria, aunque recientemente también se ha considerado la vía ocular. Las exposiciones directas que más perjudican a los trabajadores suelen ser por vía tópica seguida de la respiratoria, en términos generales el nivel de afectación depende de la concentración del pesticida [2], [1]. Por otro lado, las exposiciones indirectas son aquellas que se dan como resultado de un proceso de control de vectores y que, debido a las situaciones climáticas, como el viento o lluvia favorecen su arrastre a zonas urbanas, asimismo existen alimentos, tanto naturales como procesados, que contienen residuos de pesticidas ya sea de su etapa de crecimiento o almacenamiento. Otra fuente indirecta es por medio de productos de limpieza del hogar, de mascotas, personales y cuidado del jardín [1], [9].

En general, los síntomas de intoxicación dependen de la vía de exposición y la cantidad del pesticida, su manifestación se puede clasificar de la siguiente manera: aguda, la aparición de los síntomas se da poco tiempo después del contacto con la sustancia, aproximadamente de 12 a 24 horas, es común que esta exposición se dé por concentraciones altas de pesticida, crónica, son exposiciones de dosis muy bajas durante largos periodos de tiempo y con efectos a largo plazo, en este grupo encontramos a los llamados pesticidas inhibidores de colinesterasas. Para ambos casos, los síntomas comunes van desde debilidad en todo el cuerpo, sudoración, confusión, cambios en la frecuencia cardiaca, convulsiones, coma o incluso la muerte [1] ,[7].

Por este motivo, es esencial encontrar métodos efectivos y de uso fácil para la detección de estas sustancias, principalmente en casos en los que la intoxicación no es tan evidente o se da a largo plazo. A continuación, se hará un pequeño análisis de los métodos de detección estudiados a lo largo de las últimas dos décadas.

1.4 DETECCIÓN DE LOS PESTICIDAS.

Debido a la toxicidad previamente mencionada de los pesticidas, ha sido de gran interés para científicos investigadores y personas dedicadas al sector salud desarrollar métodos para su detección. Las técnicas de laboratorio utilizadas han sido diversas, sin embargo, los métodos cromatográficos son los más explotados, algunos ejemplos de estas técnicas son la cromatografía de gases con diferentes detectores y cromatografía líquida de alta presión con detección de arreglo de diodos UV/Vis, no obstante estos métodos son conocidos por ser costosos y requerir tiempo largos de análisis. En consecuencia se buscaron alternativas menos costosas y más eficientes, en este sentido, el uso de sensores y biosensores electroquímicos se han desarrollado considerándose una buena herramienta para la detección de pesticidas [11]. Un sensor es un dispositivo que se utiliza para la medición directa de un componente determinado en una muestra, consiste de un elemento de reconocimiento químico que interactúa con el analito y genera una señal eléctrica, proporcionando información analítica

[23]. Un biosensor cumple el mismo propósito que el sensor pero su elemento de reconocimiento está compuesto por un material biológico como bacterias, enzimas o combinaciones, los cuales se colocan en contacto con un sistema transductor [10].

1.4.1 BIOSENSORES PARA LA DETERMINACIÓN DE PESTICIDAS.

Un biosensor enzimático utiliza las enzimas para la detección de pesticidas mediante una detección indirecta, es decir, mediante la inhibición de la enzima. En la última década se han desarrollado diversos estudios para mejorar la detección de pesticidas, así como el estudio de los tiempos de inhibición e inmovilización de las enzimas [21], [24], [25]. Algunos de los estudios que destacan sobre los biosensores enzimáticos, son los llevados a cabo por Barcelci y col. en el cual se valida la detección de pesticidas organofosforados por métodos electroquímicos comparados con la cromatografía de líquidos [26], E. Rodríguez Sevilla y col. quienes estudiaron la evaluación de diferentes métodos de inmovilización en biosensores serigrafiados, demostrando una correlación directa con el método de inmovilización y la sensibilidad de los mismos [27] y Gabriela Valdés R. y col. desarrollaron biosensores de Acetilcolinaesterasa (AChE) genéticamente modificada, inmovilizadas en una membrana polimérica fotosensible, los cuales mostraron parámetros analíticos con buen desempeño ante pesticidas y tiempos de respuesta cortos [11].

1.4.2 NANOESTRUCTURAS PARA MEJORAR EL DESEMPEÑO DE DISPOSITIVOS ANALÍTICOS.

El uso de materiales nanoestructurados en los sensores electroquímicos han sido de gran utilidad, diversos investigadores han propuesto y estudiado sensores modificados con nanopartículas de Oro, nanopartículas de Oro con β -Ciclodextrina, nanopartículas de plata, nanotubos de carbono, etcétera, en los cuales se observan incrementos en la sensibilidad del sensor [28], [29], [30]. Además la incorporación de este tipo de nanoestructuras a los biosensores, ha sido estudiada en años recientes, demostrando diversas ventajas como el aumento de la sensibilidad y estabilidad de los sensores enzimáticos ya que la incorporación de estos materiales aumenta el área electroactiva del biosensor [31].

LAS ENZIMAS: CATALIZADORES BIOLÓGICOS Y SU INHIBICIÓN.

1.5 LA FUNCIÓN DE LAS ENZIMAS.

Una enzima es considerada un catalizador biológico[32]. En muchas reacciones bioquímicas que se llevan a cabo en el organismo la catálisis es esencial, de esta forma las células aprovechan estas reacciones y catalizan los productos de la reacción eficientemente. Es por esto que las enzimas juegan un papel de suma importancia ya que la mayoría de los catalizadores, aunque no todos, son proteínas que denominamos enzimas debido a que poseen un elevado grado de especificidad con respecto al sustrato [33]. No obstante, la cuestión de cómo las enzimas aceleran las reacciones fue conocida hasta mediados del siglo XX con la teoría del estado de transición, la cual sugiere que este estado se debe a la interacción de una región llamada sitio activo de la enzima con el sustrato, como se muestra en la Figura 1.2 [32]. Conocer tanto el funcionamiento del sitio activo como su tipo es esencial para entender las interacciones que puede tener la enzima con otras moléculas o sustancias.

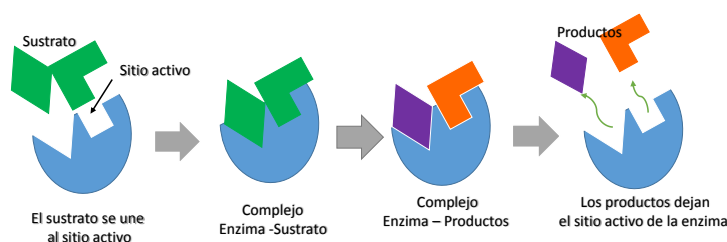


Figura 1.2. Esquema que representa la interacción del sitio activo de una enzima con el sustrato.

Como se observa en la figura 1.2, el sitio activo es una especie de hendidura rodeada por cadenas laterales de aminoácidos que facilitan la unión del sustrato y por otras cadenas laterales que intervienen en la catálisis.[31], [34].

1.6 INHIBICIÓN ENZIMÁTICA.

La actividad de las enzimas puede llegar a ser bloqueada de diversas formas, esto se debe a que otras moléculas semejantes en estructura pueden unirse o bloquear a los sitios activos de la enzima generando la inhibición. En estos casos, el inhibidor compite con el sustrato como se muestra en la Figura 1.3. Dependiendo del tipo de moléculas inhibidoras, la inhibición puede ser reversible o irreversible. El primer caso implica una unión no covalente de la enzima con el inhibidor que puede revertirse cuando el inhibidor se elimina del sistema. Cuando es irreversible se forma una unión covalente, incapacitando a la enzima y generando una toxicidad en el organismo [33].

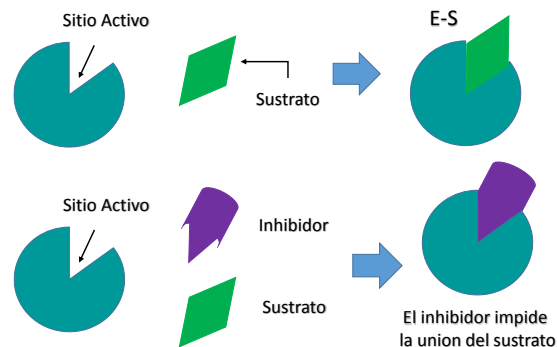


Figura 1.3. Esquema que representa la inhibición de una enzima, tanto con el sustrato como con el inhibidor y la forma en que se ajustan al sitio activo de la enzima.

CAPÍTULO 2

CONSTRUCCIÓN DE UN ISE SELECTIVO A IONES DE ACETILCOLINA

Un sensor potenciométrico basa su respuesta en la diferencia de potencial que se da gracias a la interacción del analito con un elemento de reconocimiento. En el caso específico de los ISE es fundamental entender que la medición efectuada está relacionada con la actividad de las especies en la disolución.

2.1. MECANISMO DE RESPUESTA DE UN ISE.

A diferencia de otros sensores potenciométricos, en los ISE se utiliza una membrana permeable y selectiva que se comporta como un compuesto portador de iones entre la solución interna de la membrana y la solución de la muestra a analizar. Las membranas de los ISE suelen estudiarse en condiciones de corriente nula, es decir:

Referencia externa | muestra || membrana || solución interna | referencia interna

Aunque existen diversos tipos de membrana, una de las más utilizadas debido a las ventajas que ofrece son las membranas de Cloruro de polivinilo (PVC) [35].

2.2. MEMBRANA POLIMÉRICA.

Las membranas poliméricas selectivas son físicamente un líquido de alta viscosidad, semipermeables e inmiscibles, teniendo como componentes una matriz de polímero de alta densidad, una sal lipofílica que actúa como intercambiador iónico y un ionóforo que es

utilizado para dotar a la membrana de selectividad para una especie determinada como se observa en la Figura 2.1 [12].

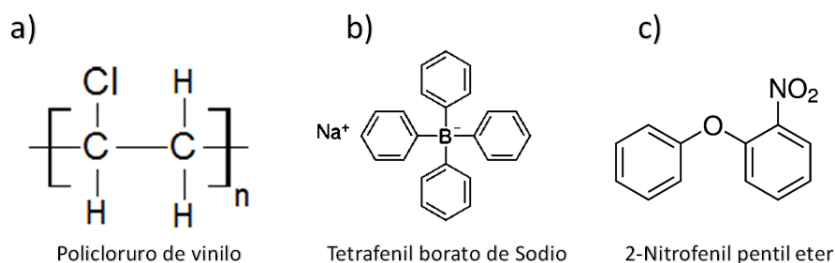


Figura 2.1. Componentes de una membrana polimérica: a) Matriz (PVC), b) Ionóforo (tetrafenil borato de Sodio) y c) Plastificante (2-Nitrofenil pentil éter).

El desarrollo del Cloruro de polivinilo (PVC) como matriz estándar en la elaboración de membranas poliméricas inició con Shatkay y col. cuando propusieron un ISE selectivo a Ca^{2+} basado en un ácido organofosfórico, en este estudio se demostró que la utilización de PVC como matriz para la membrana puede dar una respuesta ante cationes, iones con carga positiva, debido a las impurezas presentes en el material. [35]. La importancia de estos sitios radica en que explica la permselectividad de la membrana. Cabe resaltar que, aunque una fracción de sitios iónicos se origina regularmente a partir de impurezas de los componentes de la membrana, la fracción dominante de estos se incorpora deliberadamente para mejorar su rendimiento, en consecuencia, la respuesta de un ISE se basa en el ionóforo. Los sitios iónicos añadidos intencionadamente se utilizan hoy para disminuir la resistencia eléctrica de la membrana y la interferencia de los contraiones, además se aprovechan para controlar la selectividad y acortar el tiempo de respuesta de los ISE [36]. Asimismo, otra contribución ha sido la introducción de electrodos tipo composite para la construcción de un ISE, a diferencia de los otros sensores, estos electrodos no requieren de una solución interna, por lo que se le conocen como electrodos de estado sólido, en este sentido, J. Juárez-Gómez y col. estudiaron la optimización de estos electrodos, variando las concentraciones de ionóforo, obteniendo que el 62% de ionóforo dentro de la membrana polimérica es el porcentaje optimo de la misma, permitiendo que su selectividad ante cationes de Hg(II) incremente [13].

2.3. LÍMITE DE DETECCIÓN (LD) EN LOS ISE

La curva potenciométrica de un ISE tiene la forma mostrada en la Figura 2.2, en donde existen tres zonas importantes, en la zona 1 el electrodo aún no detecta la diferencia de potencial debido a que las concentraciones del analito de interés en la solución son pequeñas, en la zona 2, o también conocida como zona mixta, el electrodo comienza a tener respuesta pero ésta aún no es estable, y en la zona 3 la cual es conocida como zona lineal en donde el electrodo mantiene una respuesta favorable ante el analito de interés. En este intervalo de concentración el potencial aumenta conforme aumenta la concentración y su pendiente se encuentra regida por la ecuación de Nernst [13], [14]. La diferencia fundamental de los ISE es su respuesta logarítmica en comparación con los métodos lineales, por lo que se justifica otro tipo de definición del límite de detección. Según la IUPAC (Unión Internacional de Química Pura y Aplicada), el LD es la actividad (o la concentración) del ion analizado en el punto de intersección de las curvas de extrapolación de las zonas 1 y 3 [35].

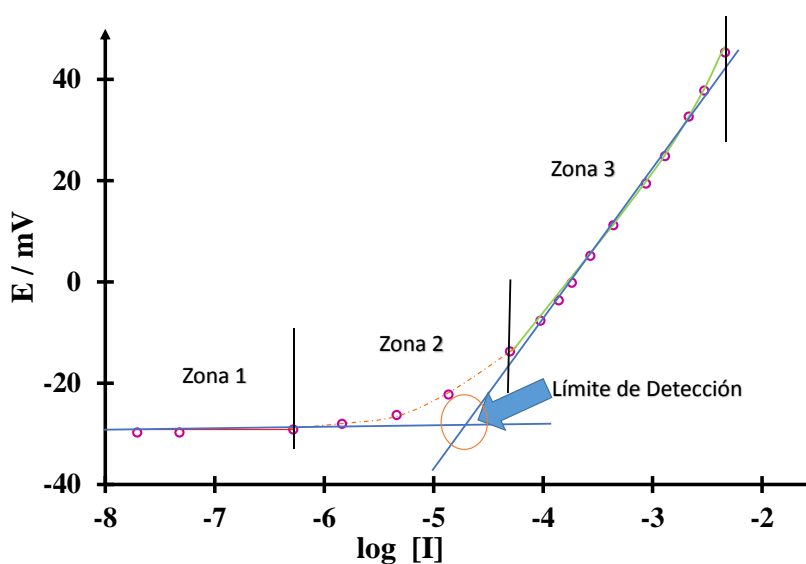


Figura 2.2. Gráfica representativa de las zonas que componen a una curva de potenciometría y la obtención del límite de detección.

METODOLOGÍA

2.4. ANÁLISIS DE LA SELECTIVIDAD DEL ISE A LA ACETILCOLINA CON DIFERENTES PLASTIFICANTES.

Como se mencionó anteriormente, es primordial encontrar una membrana que sea selectiva, en este caso en específico a los iones de la ACh^+ por lo que el primer estudio que se realizó fue probar diferentes plastificantes y así verificar que las membranas seleccionadas fueran sensibles ante la ACh^+ además de observar la reproducibilidad de los electrodos por lo que se llevaron a cabo los estudios potenciométricos por triplicado.

Estudios electroquímicos.

Todos los estudios que se llevaron a cabo en este trabajo fueron electroquímicos utilizando la técnica de potenciometría (Ver Anexo 1) en un sistema electroquímico el cual se definirá más adelante para cada uno de los estudios, se llevaron a cabo utilizando un potencióstato Epsilon de la marca BASi. Además, con el objetivo de asegurar las condiciones adecuadas del electrodo se lleva a cabo una potenciometría durante 180 segundos. Es importante mencionar que los electrodos se mantienen sumergidos en agua durante el tiempo que no se utilizan para garantizar que la membrana polimérica se mantenga hidratada.

Reactivos.

Se utilizaron reactivos de grado analítico. (NaTPB) Tetrafenil borato de sodio, (THT) tetrahidrofurano, (NPOE) 2-nitrofenil éter de octilo, (DBBP) Dibutil butilfosfonato, (NPE) 2-nitrofenil éter de pentilo, (Sebacato) Bis (2-ethylhexyl) sebacato, (Adipato) Adipato de bis (1-butylpenty) de la marca Fluka. (PVC) policloruro de vinilo de alto peso molecular, (Ch) Cloruro de Colina y (ACh) Cloruro de Acetilcolina de la marca Sigma-Aldrich. Todas las soluciones se prepararon con agua destilada y desionizada a 18.2Ω obtenida de un equipo Milli-Pore.

Electrodos.

Los electrodos empleados fueron electrodos impresos, mejor conocidos como screen printed o serigrafiados, para más información véase el Anexo 2.

Preparación de Membrana polimérica.

Con el objetivo de buscar una membrana polimérica que sea selectiva ante el ion ACh^+ se prepararon 5 diferentes membranas siguiendo una composición de PVC al 33.2%, Plastificante al 66.3% e ionóforo al 0.5% [13], utilizando diferentes plastificantes como se muestra en la Tabla 2.1.

Sistema Electroquímico.

Para los estudios potenciométricos se utilizó una celda con baño maría a $30^{\circ}C$ y en agitación constante de 400rpm. Utilizando los electrodos serigrafiados previamente descritos. Estos electrodos fueron acondicionados sumergiéndolos en una solución de ACh $0.1 \times 10^{-4} M$, durante 30 minutos. Para probar su respuesta se preparó una solución de ACh $0.1M$ y diluciones que van desde $1.96 \times 10^{-8} M$ hasta $4.44 \times 10^{-3} M$, las cuales se fueron agregando a la celda electroquímica.

Tabla 2.1. *Plastificante utilizado de acuerdo a la membrana.*

Electrodo	Membrana	Plastificante	Fórmula
1	DBBP	Dibutil butilfosfonato	$CH_3(CH_2)_3P(O)[O(CH_2)_3CH_3]_2$
2	NPE	2-nitrofenil éter de pentilo	$C_{11}H_{15}NO_3$
3	Sebacato	Bis (2-etilhexil) sebacato	$[-(CH_2)_4CO_2CH_2CH(C_2H_5)(CH_2)_3CH_3]_2$
4	ADIPATO	Adipato de bis(1-butilpentil)	$C_{24}H_{46}O_4$
5	NPOE	2-nitrofenil éter de octilo	$O_2NC_6H_4O(CH_2)_7CH_3$

Resultados y Discusión.

En la Figura 2.3 se muestran las curvas de calibración para la ACh^+ y los diferentes plastificantes utilizados, en todas las curvas se observa una zona de linealidad en donde el electrodo es sensible ante la ACh^+ , la cual varía dependiendo del plastificante, para el caso del DBBP, a partir de los valores del logaritmo de potencial entre -4 y -5, es en donde se aprecia esta zona. En las Figura 2.3b y 2.3d con plastificante NPE y ADIPATO respectivamente, la zona lineal comienza a partir del valor del logaritmo de -5, finalmente en la Figura 2.3c, la zona lineal comienza entre los valores de -5 y -4.

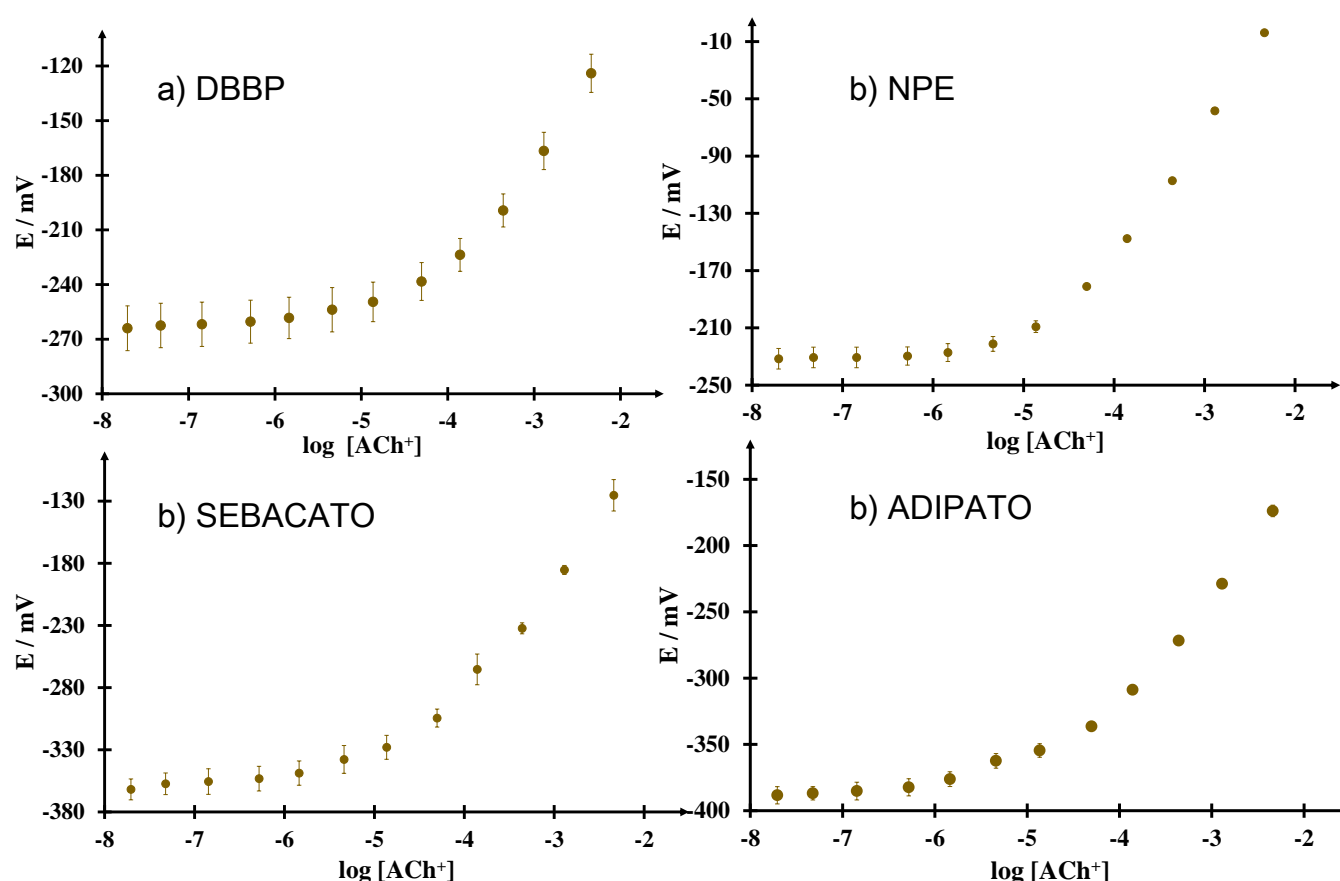


Figura 2.3. Curvas de calibración de $[ACh^+]$ para a) electrodo con plastificante DBBP, b) electrodo con plastificante NPE, c) electrodo con plastificante Sebacato y d) electrodo con plastificante ADIPATO.

La señal del electrodo 5, con NPOE, se muestra en la Figura 2.4, donde se tiene que en el primer estudio (puntos morados), se observa una tendencia similar a los electrodos de la Figura 2.1, sin embargo, al llevar a cabo el segundo y tercer estudio, representados por los triángulos rosas y puntos verdes, respectivamente, ya no se obtiene esta tendencia, puesto que en todas las

concentraciones de ACh^+ se obtiene un potencial constante, es decir, no existe un aumento de potencial conforme se aumenta la concentración de la ACh^+ , esto nos indica que la membrana con plastificante NPOE no es adecuada para iones de ACh por lo que se descarta tanto para estudios posteriores como para los cálculos de sus parámetros analíticos.

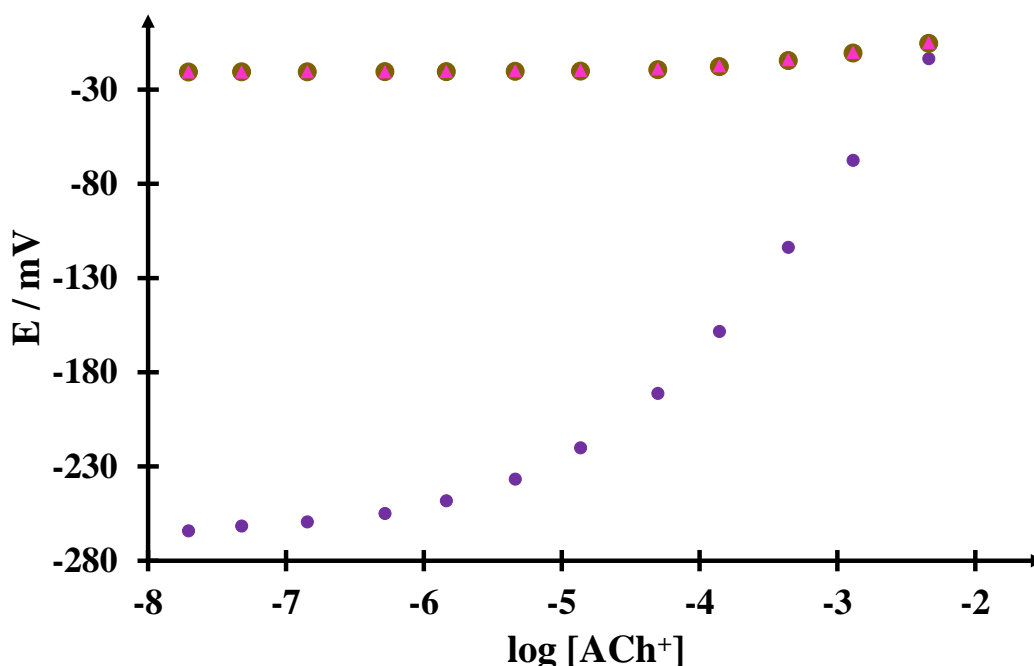


Figura 2.4. Curvas de calibración de ACh^+ para el electrodo con plastificante NPOE en donde los puntos morados representan el primer estudio y los triángulos rosas y círculos verdes el segundo y tercer estudio potenciométrico respectivamente.

De las curvas de calibración anteriores es posible obtener los datos necesarios para calcular los parámetros analíticos como son: la pendiente (m) y el límite de detección (LD), en donde, como se explicó previamente en este capítulo, se espera que para este tipo de electrodos, la pendiente se acerque a un comportamiento Nernstiano, es decir se encuentre cercana a 59.2mV/década, ya que el valor de la pendiente se relaciona directamente con la sensibilidad del electrodo. Los resultados de la pendiente, LD, intervalo de linealidad y R^2 , para los cuatro primeros electrodos, son mostrados en la Tabla 2.2, en donde podemos observar que solamente el electrodo 1 presenta un comportamiento Nernstiano, para el resto de los

electrodos el comportamiento de los mismos se considera supra-Nernstiano puesto que su pendiente se encuentra por encima del valor mencionado.

Tabla 2.2. Parámetros analíticos obtenidos de las curvas de calibración de los electros 1, 2, 3, y 4.

Electrodo	Pendiente mV/década	LD mol/L	R ²
1	66.1 ± 4.7	(5.3 ± 3) x10 ⁻⁵	0.99
2	81.1 ± 5.6	(1.31 ± 0.60) x10 ⁻⁵	0.99
3	71.5 ± 6.7	(7.4 ± 4.9) x10 ⁻⁶	0.98
4	85.4 ± 4.3	(2.2 ± 1.3) x10 ⁻⁵	0.99

Conclusiones.

Con base a lo discutido anteriormente se concluye que las membranas con plastificante NPE (2) y ADIPATO (4) son las que mejor reproducibilidad presentan y las más confiables para la detección de iones de ACh⁺. Sin embargo, es necesario ver si estas membranas son selectivas a la ACh⁺, para esto se lleva a cabo un estudio de iones interferentes que pueden interferir con la señal de la ACh⁺.

2.5. INTERFERENCIAS.

La inferencia en los ISE que puede ser expresado de la siguiente forma:

$$[\text{Ion}]_{\text{total}} = [\text{Ion}]_{\text{añadido}} + [\text{Ion}]_{\text{interferente}}.$$

Tomando el coeficiente de selectividad potenciométrica $K_{\text{Ion}, \text{int.}}^{\text{pot}}$, donde int. se refiere el ion interferente y aplicándolo a la ecuación de Nernst se obtiene la siguiente expresión matemática mejor conocida como la ecuación de Nikolsky- Eisenman.

$$E = E^{\circ} + \frac{RT}{2F} \ln[\text{Ion}]_{\text{añadido}} + K_{i,j}^{\text{pot}} [\text{Ion}_{\text{int.}}] \quad (2.1)$$

Donde E° es el potencial estándar, R es la constante de los gases ideales, T es la temperatura y F es la constante de Faraday.

De esta forma la ecuación 2.1 es la utilizada para calcular el grado de interferencia que se puede presentar en un sistema de análisis. En el caso de la ACh, se presentan diversos interferentes catiónicos como lo son Na^+ , K^+ , H^+ y su principal interferente ion Colina (Ch^+) Uno de los métodos aplicados para calcular la interferencia de los iones secundarios ante el ion primario es el de las soluciones separadas.

2.5.1. MÉTODO DE LAS SOLUCIONES SEPARADAS.

Este método consiste en preparar soluciones de ambos iones en diferentes concentraciones, construyendo sus curvas de calibración como se muestra en la Figura 2.5, en la cual se representa una interferencia de tipo catiónica.

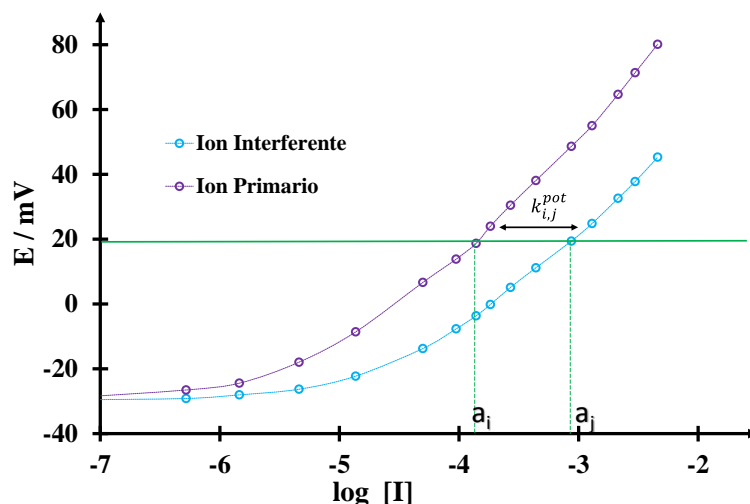


Figura 2.5. Gráfico de potenciometría de un ion primario (puntos morados) y su ion interferente (puntos azules).

La ecuación para el potencial de cada uno de los iones está dada por las ecuaciones 2.2 y 2.3:

- Para el Ion principal

$$E_i = E^\circ + \frac{RT}{z_i F} \ln a_i \quad (2.2)$$

- Para el Ion interferente

$$E_{int} = E^\circ + \frac{RT}{z_i F} \ln(K_{i,j}^{pot} a_j^{z_i/z_j}) \quad (2.3)$$

Donde E_i es el potencial del ion principal, E_{int} es el potencial del ion interferente, E° es el potencial estándar, R es la constante de los gases ideales, T es la temperatura, F es la constante de Faraday, $K_{i,j}^{pot}$ es el coeficiente de selectividad potenciométrica, a_i es la actividad del ion principal, a_j es la actividad del ion interferente, Z_i es la valencia del ion principal y Z_j valencia del ion interferente. En ambas curvas la pendiente de la recta es la misma por lo que se considera el mismo potencial para ambos iones, e igualando las ecuaciones 2.2 y 2.3 se llega a la expresión:

$$K_{i,j}^{pot} = \frac{a_i}{a_j^{Z_i/Z_j}} \quad (2.4)$$

Cuanto menor sea el valor de $K_{i,j}^{pot}$ el electrodo será más selectivo y en consecuencia la interferencia será menor. Esto significa que, si las constantes de interferencia se aproximan a cero, su término matemático también se aproxima a cero por lo que se reduce a la ecuación de Nernst para un electrodo selectivo. Cuando esto ocurre se dice que el electrodo se comporta idealmente, mejor conocido como comportamiento Nernstiano [12].

2.6. RESPUESTA DEL ISE A DIFERENTES CATIONES.

La respuesta del electrodo frente a otros iones de interés se determinó a través del cálculo de los coeficientes de selectividad potenciométricos, empleando el método de las soluciones separadas, tal como se explicó con anterioridad. Cabe mencionar que para cada interferente se usaron sistemas electroquímicos independientes, en los cuales, utilizando la técnica de potencimetría, se fueron haciendo adiciones de cada ion a diferentes concentraciones, las medidas potenciométricas se llevaron a cabo en agua desionizada con el fin de evitar la contribución de otros iones en la respuesta total de los electrodos.

Resultados y Discusión.

En la Figura 2.6 se advierten las curvas de calibración para la ACh^+ mostrada en color magenta y la de sus iones interferentes mostrados en gris, los cuales son Na^+ , K^+ , H^+ y CH^+ , para cada electrodo con diferente plastificante, en todas las curvas se observa que tanto como la ACh^+ como sus interferente muestran una diferencia de potencial conforme aumenta la concentración del ion. Para la construcción de estas curvas se fueron añadiendo diferentes concentraciones de cada ion en soluciones separadas. En la Figura 2.6a, para el plastificante DBBP se observa en la zona de linealidad señales de potencial muy similares entre los iones interferentes y la señal de ACh^+ , esta similitud en las señales no se observa en la Figura 2.6b, ya que los iones interferentes muestran una señal menor a la señal obtenida para el ion ACh^+ . Para el caso de Sebacato, Figura 2.6c, se aprecia que, la señal de los iones es cercana a la señal de la ACh^+ y finalmente para el electrodo con ADIPATO, Figura 2.6d se advierte que las señales de los iones interferentes son diferentes a la señal de la ACh^+ , es decir se encuentran a un potencial menor.

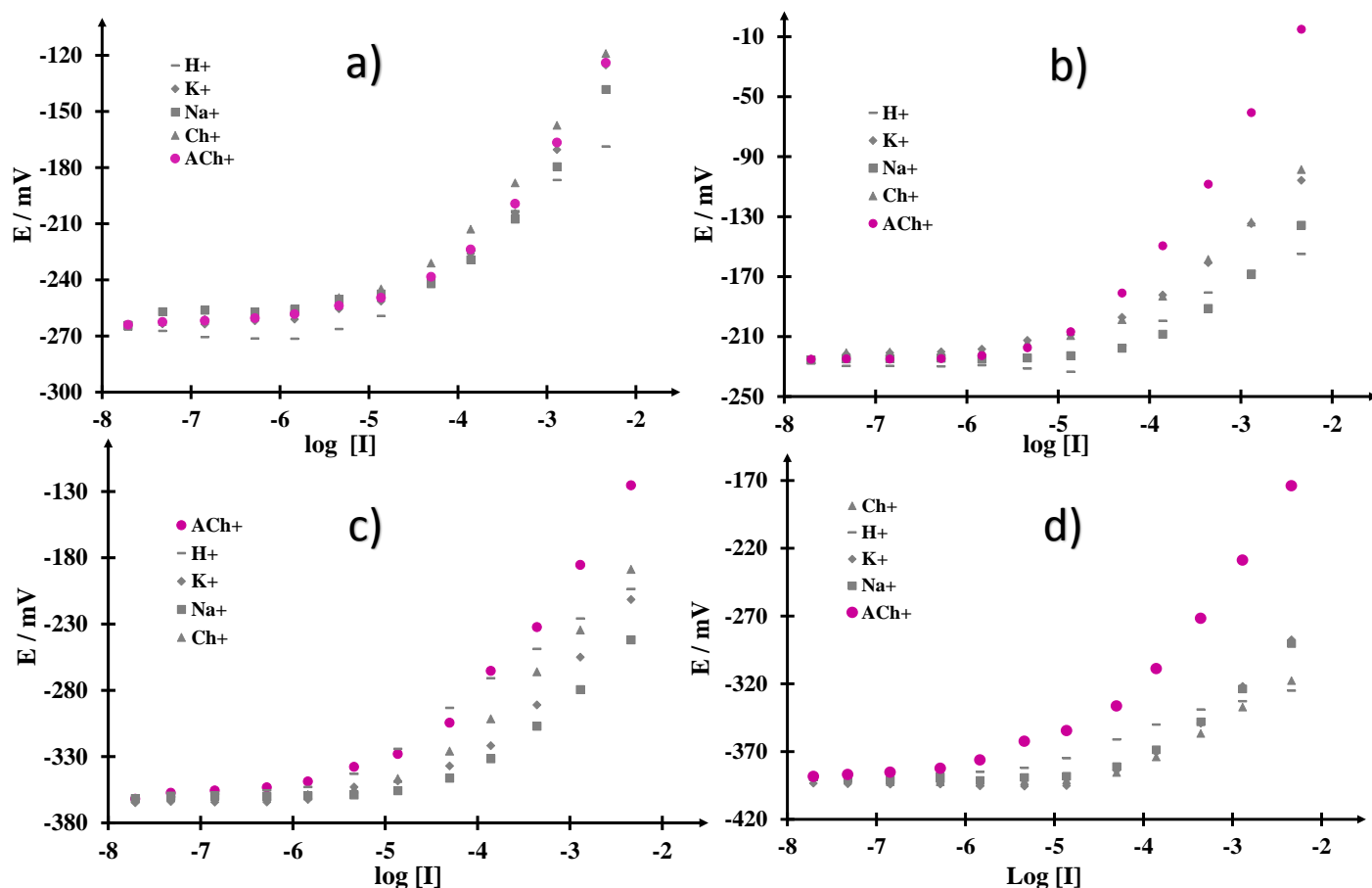


Figura 2.6. Curvas de calibración para los iones interferentes (Ch^+ , H^+ , K^+ , Na^+) con respecto a la ACh^+ donde $[I]$ representa la concentración de cada ion.

Para conocer el grado de interferencia, se procede a calcular las constantes de interferencia utilizando la ecuación 2.4. La Ch^+ se considera como el interferente principal debido a la reacción de hidrólisis de la ACh . En la Tabla 2.3 se muestran los resultados de las constantes de interferencia para el catión Ch^+ con respecto a la ACh^+ , así como la pendiente obtenida con cada electrodo, cabe señalar que el valor de las constantes de interferencia se presentan como el logaritmo del coeficiente de selectividad dado que es una forma matemática más confiable para conocer este valor, entre mayor sea el valor del logaritmo menor es la interferencia. De los valores obtenidos en la tabla se observa que electrodo con ADIPATO (4) es el que presenta menor interferencia para el ion Ch^+ , lo cual es congruente con lo que se observa de manera cualitativa en la Figura 2.6, en comparación con el electrodo con DBBP (1) el cual presenta una fuerte interferencia con la ACh^+ . Para el caso de las pendientes, los electrodos 1 y 3 presentan

un comportamiento cercano al Nernstiano de 57.26mV/década y 63.15mV/década respectivamente, sin embargo, si observamos en la Tabla 2.4, donde se muestran los valores del logaritmo del coeficiente de selectividad para los demás iones interferentes con respecto a la Ch^+ , ambos electrodos presentan interferencias grandes con respecto a los electrodos. 2 y 4

Tabla 2.3. Valores de la pendiente y el coeficiente de selectividad para el ion interferente principal Ch^+ .

Electrodo	Pendiente mV/década	$-\log K_{Ch^+}^{pot}$	$\log K_{Ch^+}^{pot}$
1	57.26	-0.15	
2	51.13	0.38	-0.42
3	63.15	0.81	-0.09
4	35.22	4.58	0.66

El electrodo 4 presenta la menor interferencia con un comportamiento es sub-Nernstiano, el electrodo 2 presenta poca interferencia y mantiene un comportamiento cercano al Nernstiano, lo que nos indica que el electrodo 2 se ajusta mejor a la ecuación de Nernst.

Tabla 2.4. Valores de los coeficientes de selectividad de los iones interferentes para cada electrodo.

Electrodo	Pendiente mV/década	$-\log K_{i,j}^{pot}$				$\log K_{i,j}^{pot}$			
		Ch^+	Na^+	K^+	H^+	Ch^+	Na^+	K^+	H^+
1	57.26	-0.15	0.19	0.05	0.54		-0.73	-1.32	-0.27
2	63.15	0.38	1.03	0.37	0.99	-0.42	0.01	-0.43	0.00
3	51.13	0.81	1.79	1.11	0.98	-0.09	0.25	0.05	-0.01
4	35.22	4.58	2.54	2.33	7.17	0.66	0.40	0.37	0.86

Conclusiones.

Con base a lo anterior se concluye que los electrodos 1 y 3 presentan mal desempeño con respecto a la pendiente, LD e interferentes. En el caso de los electrodos 2 y 4, ambos son

selectivos a los iones de ACh⁺ ya que presentan poca interferencia de los cationes estudiados por lo que se considera que ambas membranas son las mejores para los estudios posteriores.

2.7. OPTIMIZACIÓN DE LOS COMPONENTES DE LA MEMBRANA SELECTIVA.

Reactivos

Se utilizaron reactivos de grado analítico, (NaTPB) Tetrafenil borato de sodio, (KTPB) Tetrafenil borato de potasio, (THT) tetrahidrofurano, (NPOE) 2-nitrofenil éter de octilo, (NPE) 2-nitrofenil éter de pentilo, (PVC) policloruro de vinilo de alto peso molecular, (Ch) Cloruro de Colina y (ACh) Cloruro de Acetilcolina de la marca Sigma-Aldrich. Se prepararon soluciones de NaCl, KCl, HCl, Ch y ACh todas 0.1M y se llevaron a cabo diluciones de cada una que van desde 1×10^{-1} M hasta 1×10^{-6} M. Todas las soluciones se prepararon con agua desionizada a $18.2 \text{ M}\Omega/\text{cm}$ obtenida de un equipo Milli-Pore.

Preparación de las Membranas poliméricas para el estudio potenciométrico variando su composición.

Se mezclan los componentes de la membrana de acuerdo a la Tabla 2.5 y se añadió THT hasta obtener una mezcla homogénea. Se procede a colocar 20 μL de la membrana polimérica sobre el electrodo composite y se colocan dentro de la estufa a 40°C durante 2 horas.

Tabla 2.5. Componentes en por ciento peso de la membrana polimérica para cada electrodo.

COMPOSICIÓN DE LAS MEMBRANAS							
Componentes	Membrana a		Membrana b		Membrana c		Membrana d
Matriz	PVC	33%	PVC	33.20%	PVC	33.20%	PVC 33%
Plastificante	NPE	62 %	NPE	66.30%	NPE	66.30%	NPE 62%
Ionóforo	KTPB	5%	NaTPB	0.50%	KTPB	0.50%	NaTPB 5%

Sistema Electroquímico

Los estudios potenciométricos se llevaron a cabo en una celda termostatada a 30°C y con agitación constante de 400rpm. Utilizando un electrodo de referencia de Ag/AgCl_{sat} y un

electrodo de trabajo tipo composite sin modificar construido previamente y de acuerdo a la composición de membrana que se observa en la Tabla 2.5. Para cada estudio se usó un sistema electroquímico nuevo. Estos electrodos de trabajo fueron previamente acondicionados sumergiéndolos en una solución de ACh 0.1×10^{-4} M, durante 30 minutos. Se utilizaron Soluciones de ACh, Ch, NaCl, KCl y HCl 0.1M y diluciones 1×10^{-1} hasta 1×10^{-6} M las cuales se fueron adicionando para construir la curva de calibración correspondiente a cada ion.

Resultados

En la Figura 2.7 (a) se observan las gráficas de las curvas de calibración de la ACh^+ y sus iones interferentes para el electrodo con una membrana compuesta por PVC al 33% como matriz, NPE al 5% como plastificante y KTPB al 62% como ionóforo, en donde se observa que, en la zona de linealidad, aumenta el potencial conforme aumenta la concentración del ion. Esta membrana presenta menor interferencia en magnitud ante los iones Na^+ , H^+ y K^+ , comparado con la señal de Ch^+ , la cual es similar a la de la ACh^+ . En la Figura 2.7 (c) se observan las curvas de calibración de la ACh^+ y sus iones interferentes obtenidas con los mismos componentes de membrana pero con 0.5% de ionóforo, 66.30% de plastificante y 33.2% de PVC, se observa que en la zona lineal aumenta el potencial conforme aumenta la concentración para los iones K^+ , H^+ , Ch^+ y ACh^+ , pero no para el catión Na. Comparando las gráficas a y b se observa que la señal del electrodo se da a un potencial mayor para la membrana con ionóforo al 0.5% y que no hay interferencia del ion Ch^+ . Para la membrana con composición 5 % de ionóforo, existe una interferencia con el ion Ch^+ .

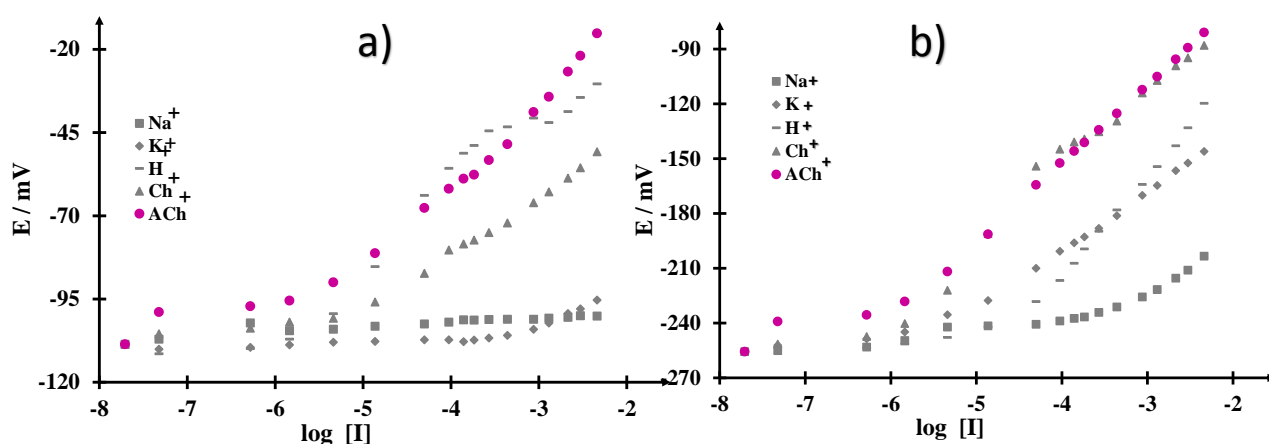


Figura 2.7. Curvas de calibración para la ACh^+ y sus iones interferentes (a) Con un electrodo con membrana compuesta por PVC al 33.2%, NPE al 62% y KTPB al 5%. (b). Con un electrodo con membrana compuesta por PVC al 33.2%, NPE al 66.3% y KTPB al 0.5%.

La Figura 2.8 (b) muestra las curvas de calibración de la ACh^+ y sus iones interferentes para una membrana compuesta por PVC al 33% como matriz, NaTPBP al 5% como ionóforo y NPE al 62% como plastificante en donde se observa, en la zona de linealidad, el aumento de potencial al tiempo que aumenta la concentración, así mismo se nota que esta membrana separa la señal de los interferentes. Por otro lado, en la Figura 2.8 (d) se observan las curvas de calibración para la ACh^+ y su interferente principal Ch^+ utilizando un electrodo con los mismos componentes de la membrana de la Figura 2.8 (IV) pero con el 0.5% de ionóforo, 66.30% de plastificante y 33.2% de PVC, notándose claramente que la señal del Ch^+ no interfiere con la de la ACh^+ ya que a pesar de que se observa una intersección las pendientes de cada ion son diferentes.

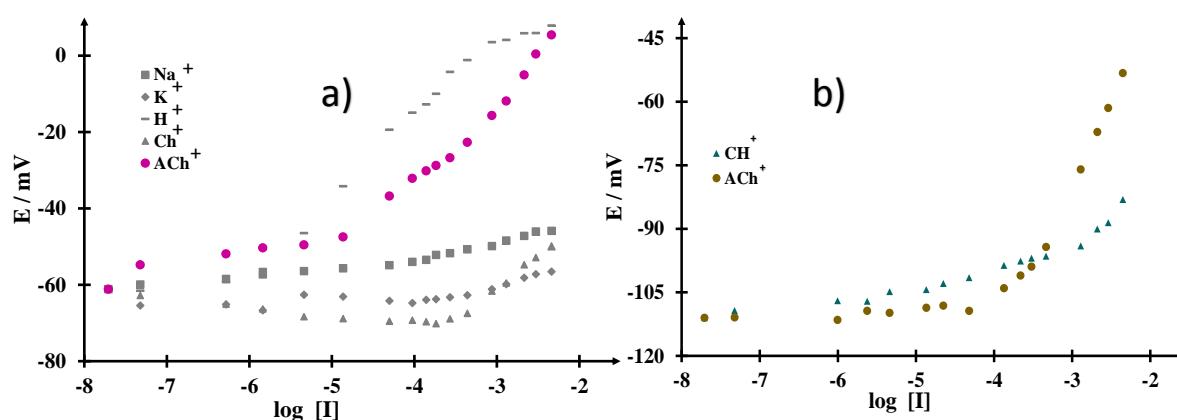


Figura 2.8. Curva de calibración para la ACh^+ y sus iones interferentes (a) Con un electrodo con membrana compuesta por PVC al 33%, NPE al 62% y NaTPB al 5%. (b). Con un electrodo con membrana compuesta por PVC al 33.2%, NPE al 66.3% y NaTPB al 0.5%.

Para conocer los valores de los parámetros analíticos se lleva a cabo un ajuste lineal de cada una de las curvas de calibración, en las Tablas 2.6 y 2.6(bis) se muestran los resultados de dichos valores en donde se corrobora que el valor de la pendiente de la ACh^+ para la membrana 3 es mayor al del ion Ch^+ , por lo que no interfiere. En general, todas las pendientes presentan comportamientos sub-Nernstianos.

Tabla 2.6. Muestra los valores de los parámetros analíticos para cada electrodo e interferentes dependiendo de la membrana utilizada.

Ion	Membrana 1		Membrana 2		Membrana 3	
	<i>m</i> [mv/década]	LD [mol/L]	<i>m</i> [mv/década]	LD [mol/L]	<i>m</i> [mv/década]	LD [mol/L]
Na ⁺	1.16 ± 0.10	(1.15 ± 0.51) x10 ⁻⁶	18.7 ± 1.5	(1.21 ± 0.37) x10 ⁻⁴	4.84 ± 0.18	(8.68 ± 0.55) x10 ⁻⁵
K ⁺	8.04 ± 0.71	(1.91 ± 0.19) x10 ⁻⁴	32.79 ± 0.42	(5.42 ± 0.75) x10 ⁻⁶	6.55 ± 0.50	(6.77 ± 0.12) x10 ⁻⁵
H ⁺	12.4 ± 1.2	(7.87 ± 0.10) x10 ⁻¹⁰	54.83 ± 0.86	(2.45 ± 1.5) x10 ⁻⁵	13.76 ± 1.3	(1.09 ± 0.73) x10 ⁻⁸
Ch ⁺	17.53 ± 0.69	(9.40 ± 2.3) x10 ⁻⁶	35.5 ± 1.3	(9.94 ± 0.54) x10 ⁻⁸	15.21 ± 0.77	(4.57 ± 0.64) x10 ⁻⁶
ACh ⁺	29.2 ± 1	(1.13 ± 0.36) x10 ⁻⁵	42.43 ± 0.27	(1.97 ± 0.76) x10 ⁻⁶	26.50 ± 1.2	(3 ± 1) x 10 ⁻⁵

Tabla 2.6. (Bis). Muestra los valores de los parámetros analíticos para el electrodo 4, de la ACh⁺ y su interferente Ch⁺.

Ion	Membrana 4	
	<i>m</i> / mV década ⁻¹	LD / mol L ⁻¹
Ch ⁺	12.98 ± 2.5	(2.97 ± 0.76) x10 ⁻⁴
ACh ⁺	34.92 ± 2.0	(1.40 ± 0.57) x10 ⁻⁴

Conclusiones.

Con base en los resultados las membranas compuestas por PVC al 33.2% como matriz, ionóforo al 0.5% y plastificante al 66.3%, son las que mejores resultados con respecto a las interferencias, de estas, la membrana compuesta por PVC al 33% como matriz, NaTPB al 0.5% como plastificante y NPE al 62% presenta la pendiente mayor, por lo que se considera que es una buena membrana para trabajar.

CAPÍTULO 3

SÍNTESIS DE LAS NANOPARTÍCULAS DE ORO Y MODIFICACIÓN DEL ELECTRODO SELECTIVO A IONES ACETILCOLINA

3.1 NANOPARTÍCULAS DE ORO (NPsAu).

Con el descubrimiento de las propiedades de los elementos a nivel nano, en la última década se han desarrollado diversos estudios para su aplicación, en específico se sabe que las NPsAu presentan excelentes propiedades catalíticas, y en el caso de la electroquímica estas presentan mejoras en la conductividad ya que facilitan el proceso de transferencia de electrones, además se ha comprobado que su uso en sensores aumenta el área superficial del mismo [37], [38]. Uno de los métodos más utilizados para obtener este tipo de nanoestructura es el coloidal, el cual se basa en la reducción de la sal de oro en presencia de un agente estabilizador, esto permite obtener nanopartículas de tamaño homogéneo. Aunque este método fue desarrollado hace muchos años, Faraday publicó el primer estudio donde observó sus propiedades ópticas. Turkevitch y col. explicaron paso a paso el proceso del método coloidal utilizando citrato trisódico logrando obtener un tamaño de NPsAu de 20nm [39].

3.2 SÍNTESIS DE LAS NPsAu.

La preparación de las nanopartículas de Oro (NPsAu) se llevó a cabo mediante el método propuesto por Turkevich y col.[40]. Primero se calentó una solución de ácido tetracloroáurico (HAuCl_4) al 0.01 % hasta alcanzar su temperatura de ebullición, en ese momento se le añadió una solución de citrato trisódico ($\text{Na}_3\text{C}_3\text{H}_5\text{O}(\text{COO})_3$) al 1 % y se dejó enfriar por unos minutos mientras el color de la solución torna de transparente a un rojo oscuro como se muestra en la Figura 3.1.



Figura 3.1. *Solución coloidal con de NPsAu.*

Una vez obtenidas las NPsAu en suspensión coloidal se procedió a soportarlas en carbón Vulcan con el objetivo de lograr una mayor dispersión, por lo que se adicionaron 20mg de carbón Vulcan XC-72R y de nuevo se colocaron en agitación constante durante 48 horas, pasado este tiempo se filtraron lentamente utilizando una bomba de vacío (ver Figura 3.2), se secaron en la estufa a una temperatura no mayor a 50°C durante 45 minutos obteniéndose un polvo oscuro.



Figura 3.2. *Filtrado de las NPsAu soportadas en carbón vulcan XC-72R.*

3.3. COMPARACIÓN DE LA RESPUESTA POTENCIOMÉTRICA UTILIZANDO ELECTRODOS SERIGRAFIADOS Y ELECTRODOS TIPO COMPOSITE.

Debido a que la superficie de los electrodos serigrafiados no puede ser renovada con facilidad, se construyen electrodos tipo composite, ya que estos presentan ventajas como que son de fácil producción, bajo costo y su superficie puede ser renovada de forma sencilla, sin embargo, es necesario hacer una comparación entre ambos electrodos para verificar que las respuestas de las señales de ambos sean similares. Para este propósito se llevaron a cabo estudios potenciométricos a las mismas condiciones que los estudios anteriores, es decir temperatura de 30°C y agitación constante de 400rpm en un sistema electroquímico

compuesto por un electrodo de referencia de $\text{Ag}/\text{AgCl}_{\text{sat}}$ y el electrodo de trabajo construido. Primero se utilizaron electrodos sin modificar y posteriormente electrodos modificado con las NPsAu, se hicieron adiciones de ACh^+ a diferentes concentraciones.

Reactivos.

Se utilizaron reactivos de grado analítico. (NaTPB) Tetrafenil borato de sodio, (THT) tetrahidrofurano, (PVC) policloruro de vinilo de alto peso molecular y (ACh) Cloruro de Acetilcolina de la marca Sigma-Aldrich y (ADIPATO) Adipato de bis (1-butylpenty) de la marca Fluka. Las soluciones y disoluciones de ACh se prepararon con agua destilada y desionizada a $18.2\text{M}\Omega/\text{cm}$ obtenida de un equipo Milli-Pore.

Preparación de Membrana polimérica para el estudio de comparación.

Se mezclan los siguiente de acuerdo a una composición de PVC al 33.2%, Plastificante al 66.3% ADIPATO e ionóforo al 0.5% NaTPB y se añaden 2mL de THT hasta obtener una mezcla homogénea y se procede a colocar 20 μL de la membrana polimérica sobre el electrodo de trabajo, después se colocan dentro de la estufa a una temperatura de 40°C durante 2 horas.

Preparación de los electrodos tipo Composite.

Los electrodos tipo composite[41], se construyeron mezclando grafito en polvo, Araldit como resina epóxica y endurecedor hasta obtener una pasta homogénea, posteriormente esta se deposita en tubo de PVC de 7mm de diámetro aproximadamente, en el cual se encuentra un contacto sólido de cobre unido a un conector previamente soldado como se muestra en la Figura 3.3 que sirve como conductor y soporte de la mezcla. El dispositivo se deja curar por 24 horas a 40°C .



Figura 3.3. Esquema de la construcción de la parte interna del electrodo composite.

Modificación de los electrodos tipo composite con NPsAu.

La metodología de su construcción es la misma que la ya descrita anteriormente, sin embargo, antes de colocar la membrana se prepara una tinta catalítica con las NPsAu previamente sintetizadas, mezclando 3mg de NPsAu con 200 μ L de etanol y 20 μ L de solución del monómero Nafión, el ISE se modificó mediante una gota de tinta catalítica de 20 μ L colocada sobre el electrodo de trabajo y dejándola secar durante a temperatura ambiente. Una vez seco, se coloca la membrana utilizando el mismo procedimiento, mencionado con anterioridad.

Resultados y Discusión.

En la Figura 3.4 se muestran las curvas de calibración para la ACh^+ , utilizando en a) electrodos serigrafiados y en b) electrodos tipo composite, ambos sin modificar y modificados con NPsAu, en donde se puede apreciar que en la zona de linealidad, con ambos tipos de electrodos existe un incremento del potencial conforme aumenta su concentración, en el inciso a, que muestra la señal de los electrodos serigrafiados, se observa que tanto el electrodo sin modificar, como el modificado con las NPsAu presentan una respuesta similar, lo mismo sucede con los electrodos tipo composite, inciso b, esto nos indica que aparentemente no existe una contribución por parte de las NPsAu ante la detección de la ACh^+ para ninguno de los electrodos. Además, se advierte que la señal de los electrodos tipo composite se encuentra a potenciales más bajos en comparación a la señal de los electrodos serigrafiados, esto afecta

directamente a la pendiente de los mismos, mostrando una pendiente menor por parte de los electrodos tipo composite. Para asegurar esta afirmación, se calculan los valores de la pendiente para cada electrodo, los cuales se muestran en la Tabla 3.1.

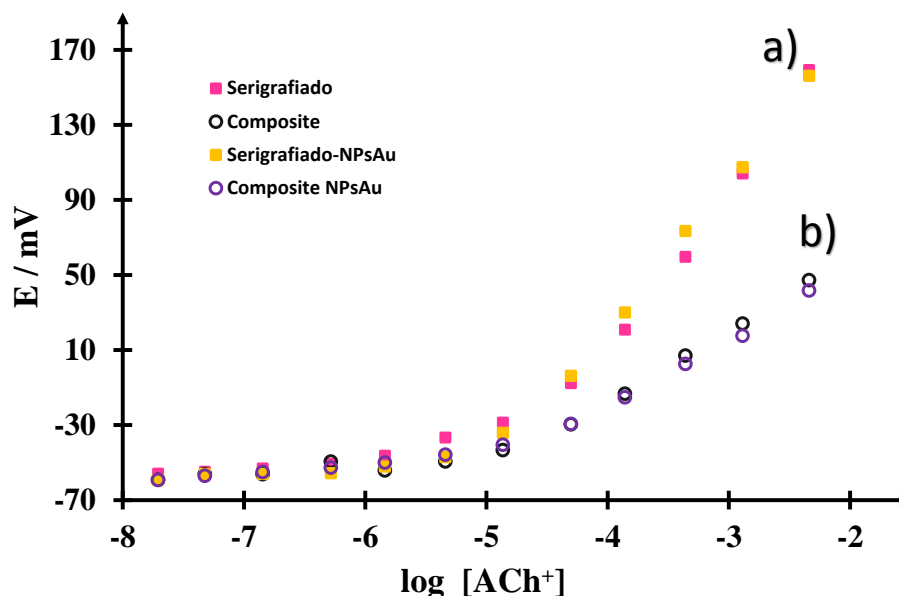


Figura 3.4. Curva de calibración para la ACh⁺, en a) los electrodos serigrafiados, en rosa se observa el electrodo sin modificar y en amarillo un electrodo modificado con NPsAu y en b) los electrodos composite, en negro sin modificar y en morado el modificado con NPsAu.

En la Figura 3.5 se observan las curvas de calibración para todos los interferentes, utilizando electrodos serigrafiados y electrodos tipo composite, en la Figura 3.5 (I) se muestra el interferente principal Ch⁺, notándose una diferencia considerable del aumento de potencial entre el electrodo serigrafiado sin modificar y el electrodo modificado con las NPsAu, lo mismo sucede en el caso de los electrodos tipo composite. Para el caso de la Figura 3.5 (II), vemos las curvas de calibración correspondientes al interferente Na⁺ en donde también se advierte que tanto para los electrodos serigrafiados como para los electrodos composite, la modificación de la superficie con las NPsAu mejora la señal ante el catión. Las Figuras 3.5 (III) y 3.5 (IV) nos muestran las curvas de calibrado para los interferentes k⁺ y H⁺ respectivamente, en donde notamos claramente que existe el aumento de potencia conforme aumenta la concentración del mismo dentro de la zona lineal; y al igual que sucede con el interferente Na⁺, la presencia

de las NPsAu en los electrodos aumentan la señal de los mismos, teniendo comportamientos muy similares tanto para los electrodos serigrafiados como para los composite.

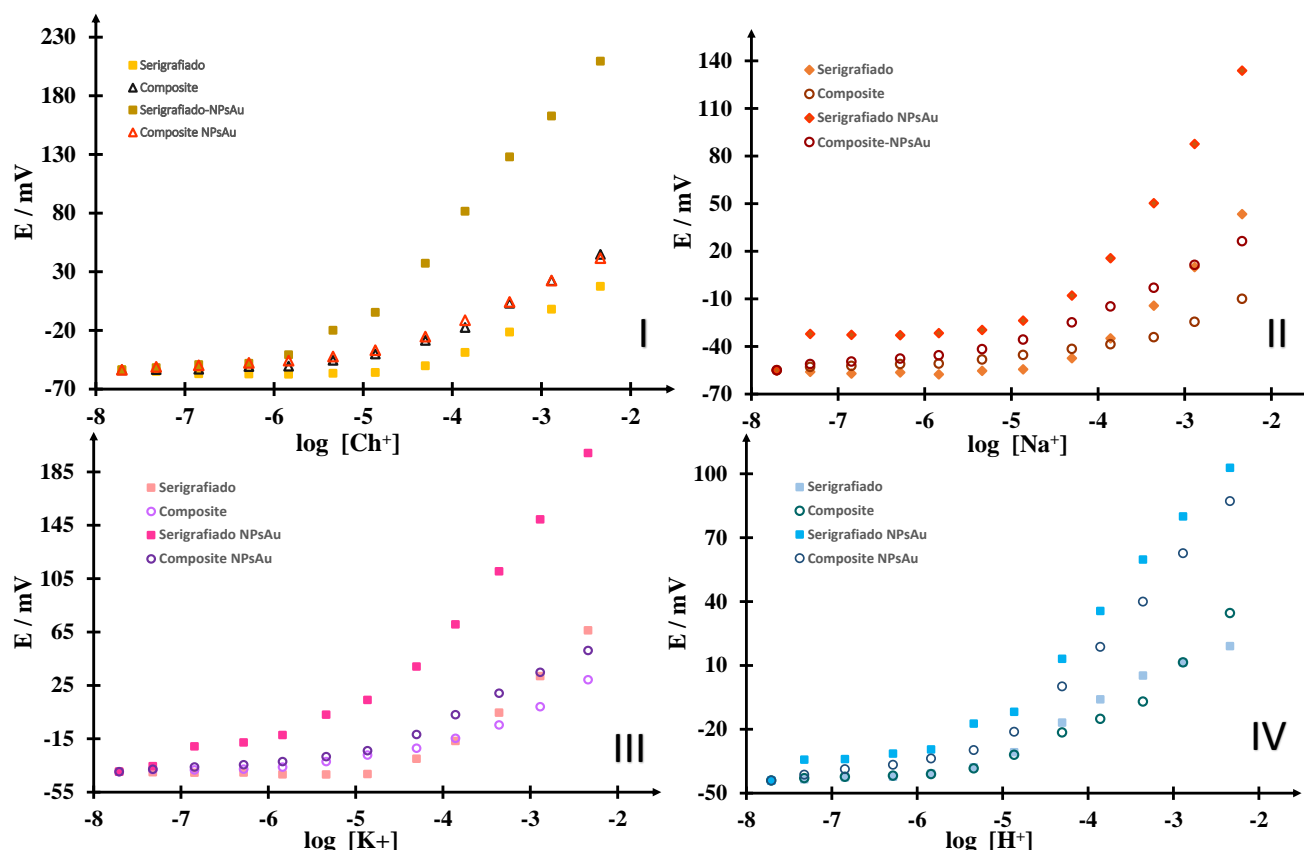


Figura 3.5. Curva de calibración para los electrodos serigrafiados y los electrodos tipo composite, **(I)** muestra la respuesta ante el catión interferente Ch^+ , **(II)** para el interferente Na^+ , **(III)** para el interferente K^+ y **(IV)** para el interferente H^+ .

Finalmente la Tabla 3.1 presenta los valores de las pendientes para la ACh^+ y cada uno de los interferentes observándose que, en general para todos los iones, las pendientes de los electrodos serigrafiados son mayores que la de los electrodos tipo composite, lo que afirma lo visto en las curvas de calibración de la Figura 3.5. En el caso específico de la ACh^+ es notable el paso de un comportamiento supra-Nernstiano con los electrodos tipo serigrafiados a un comportamiento sub-Nernstiano con los electrodos tipo composite. Por otro lado, se observa que con la modificación de las NPsAu se tiene una señal ligeramente mayor el cual es asociado a estas nanopartículas.

Tabla 3.1. Valores de las pendientes en mV/décadas para cada ion y tipo de electrodo sin modificar.

Ion	<i>m</i> / mV década ⁻¹	
	Composite	Serigrafiado
ACh ⁺	33.2 ± 2.1	75.6 ± 6.1
Ch ⁺	34.4 ± 2.4	35.2 ± 1.4
Na ⁺	11.8 ± 1.7	46.4 ± 3.7
K ⁺	19.7 ± 2.3	49.4 ± 3.9
H ⁺	25.3 ± 3.1	19.8 ± 1.4

Conclusiones.

Se puede utilizar los electrodos tipo composite para los siguientes estudios debido a que su respuesta es similar a los serigrafiados, la incorporación de las NPsAu muestra un aumento en el potencial, y una mejora en la sensibilidad de los electrodos.

3.4. RESPUESTA DEL ISE ANTE EL TAMAÑO DE LOS CATIONES.

Otro parámetro importante a analizar es ver si el tamaño de los cationes interferentes influye en el comportamiento de la membrana, por lo que se procede a llevar a cabo este estudio utilizando electrodos serigrafiados con una membrana cuya composición es de PVC al 33.2%, Plastificante al 66.3% ADIPATO e ionóforo NaTPB (Tetrafenilborato de Sodio) al 0.5%. Las mediciones potenciométricas se llevan a cabo en un sistema electroquímico con agua desionizada, manteniendo condiciones constantes de temperatura y agitación a 30°C y 400rpm respectivamente, además se estudia el efecto que tienen las NPsAu sobre el electrodo, para lo cual se comparan la respuesta de un electrodo sin modificar con la respuesta del electrodo modificado. Se añadieron diferentes concentraciones del ion a estudiar, las cuales abarcan un intervalo que va desde $1.96 \times 10^{-8} \text{M}$ hasta $4.44 \times 10^{-3} \text{M}$, en el siguiente orden de acuerdo al radio iónico, H⁺, Na⁺, K⁺, Ch⁺ y finalmente ACh⁺. Para ello se prepararon soluciones de NaCl, KCl, HCl y Ch todas 0.1M y diluciones de cada una, en un intervalo de concentración de $1 \times 10^{-1} \text{M}$ hasta $1 \times 10^{-6} \text{M}$.

Los electrodos fueron modificados con la NPsAu por el método de gota de la misma forma que la descrita con anterioridad.

Preparación de Membrana polimérica.

Para la elaboración de la membrana se mezclan los componentes descritos en el punto anterior y se añaden 2mL de THT hasta obtener una mezcla homogénea, posteriormente se procede a colocar con la ayuda de una micropipeta 10 μ L de la membrana sobre el electrodo de trabajo del electrodo screen printed y se introducen a la estufa durante 2 horas a una temperatura de 40 °C para asegurar que se evapore el THT completamente.

Resultados y discusión.

En la Figura 3.6a se puede observar la gráfica del potencial en función del logaritmo de la concentración del ion correspondiente utilizando un electrodo con membrana polimérica y sin NPsAu. El primer catión que se estudió fue el Na⁺ el cual presenta respuesta a partir de un valor de logaritmo de la concentración de -3 y un potencial aproximado a -40mV por lo que su señal se encuentra por debajo de la señal de los demás cationes, en base a los resultados obtenidos del estudio de interferentes, se esperaría el mismo comportamiento para los demás cationes interferentes, sin embargo, estos presentan señal a partir del valor de logaritmo de concentración -4, incluyendo al analito de interés ACh⁺. Para analizar más a fondo lo que sucede en la zona lineal, ésta se gráfica y se muestra en la Figura 3.6b, además se calculan las pendientes (m) y los límites de detección (LD) para cada ion interferente, los cuales se muestran en la Tabla del inserto de la Figura 4.5, en esta Figura se observa que los iones de Na⁺, K⁺ y Ch⁺ no interfieren con la señal de la ACh⁺ pero el H⁺ si interfiere con su señal, además se advierte que los iones interferentes tienen pendientes similares a la de la ACh⁺, obteniendo en promedio una diferencia de 7mV/década. Este resultado es diferente al obtenido con la misma membrana en el estudio de respuesta del ISE a diferentes cationes lo que indica una posible relación entre el tamaño del radio iónico de los cationes con la membrana.

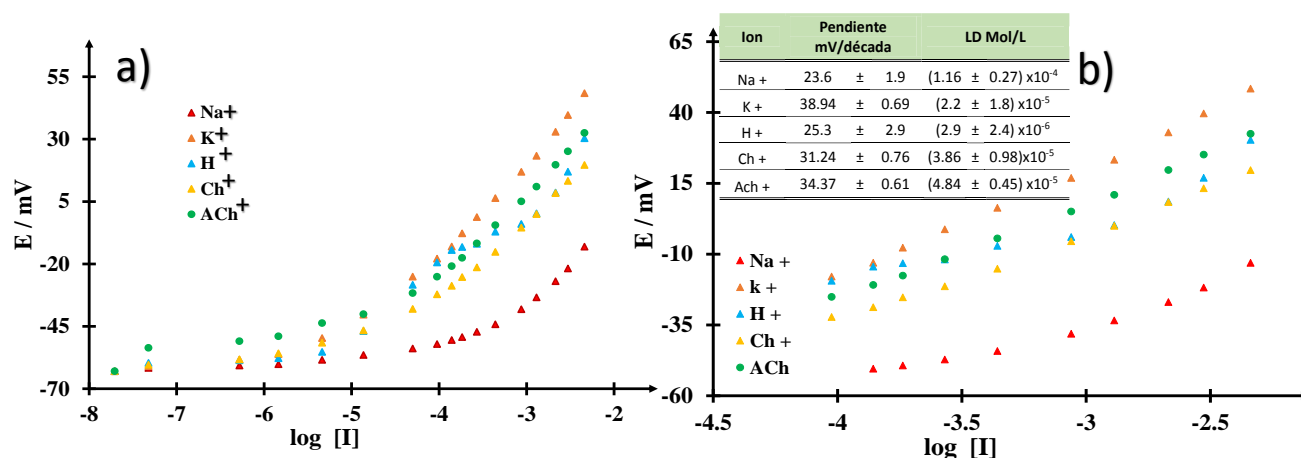


Figura 3.6. a) Curva de calibración para la ACh⁺ y sus iones interferentes, b) Muestra la zona de linealidad para la ACh⁺ y sus iones interferentes utilizando un electrodo sin NPsAu acondicionado durante 30 minutos, la tabla muestra sus parámetros analíticos.

La Figura 3.7a muestra la curva de calibrado del ion correspondiente utilizando el electrodo Serigrafado modificado con NPsAu, la zona de linealidad mostrada en la Figura 3.7b es de particular interés ya que se puede observar a detalle las posibles interferencias de los cationes, aquí se advierte notoriamente como la señal de la ACh⁺ se encuentra separada de la señal de los iones y verificando los parámetros analíticos mostrados en la Tabla del inserto de esta Figura, se nota que las pendientes de los interferentes Na⁺, K⁺ y Ch⁺ son menores que la pendiente de la ACh⁺ indicándonos que no hay interferencias, lo mismo sucede con el H⁺ aunque su señal se encuentra en un potencial mayor, esta no interfiere con la señal de ACh⁺. Analizando las pendientes del electrodo en cada ion, estas cambiaron con respecto a las pendientes del electrodo sin modificar, en general, las pendientes bajaron presentando un comportamiento Sub-Nernstiano.

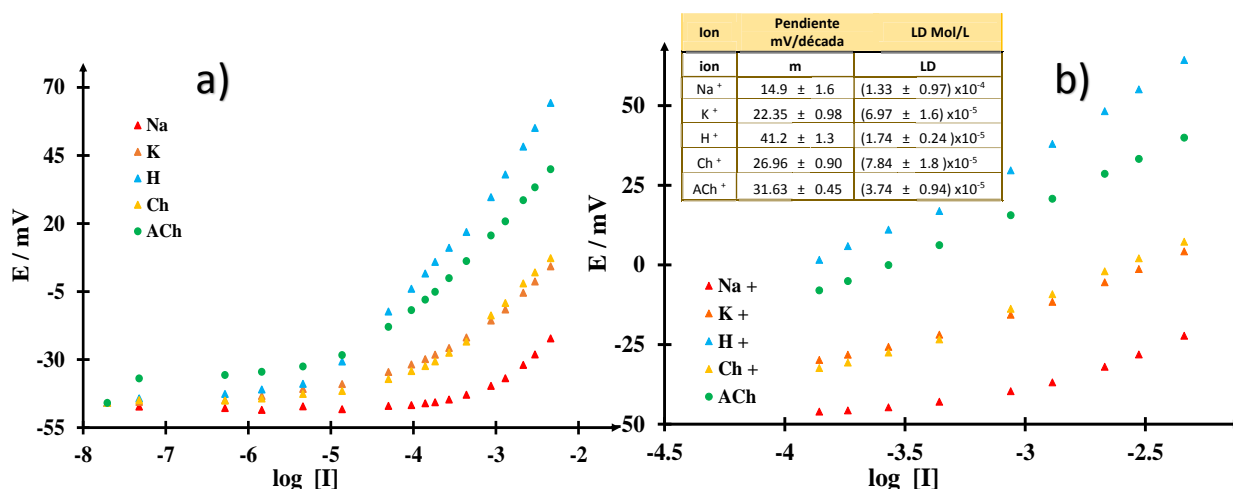


Figura 3.7. a) Curva de calibración para la ACh⁺ y sus iones interferentes, b) Muestra la zona de linealidad para la ACh⁺ y sus iones interferentes con un electrodo con NPsAu acondicionado durante 30 minutos, la tabla muestra sus parámetros analíticos.

En la Tabla 3.2 se muestran los resultados de los parámetros analíticos tanto del electrodo sin modificar como del electrodo modificado con NPsAu. Comparando las pendientes del ion ACh⁺ observamos que se mantienen prácticamente igual, solo hay una diferencia de 2.74 mV/década siendo menor la del electrodo modificado. En el caso del LD, para la ACh⁺, existe una diferencia de 1.1×10^{-5} mol/L en favor del electrodo modificado, lo que indica que las NPsAu brindan un límite de detección menor en comparación con el ISE sin modificar.

Tabla 3.2 Resultados de los parámetros analíticos para cada electrodo e interferentes.

Ion	m / mV década ⁻¹		LD / mol L ⁻¹	
	Sin NPsAu	Con NPsAu	Sin NPsAu	Con NPsAu
Na ⁺	23.6 ± 1.9	14.9 ± 1.6	(1.16 ± 0.27) × 10 ⁻⁴	(1.33 ± 0.11) × 10 ⁻⁴
K ⁺	38.94 ± 0.69	22.35 ± 0.98	(2.20 ± 1.08) × 10 ⁻⁵	(6.97 ± 1.60) × 10 ⁻⁵
H ⁺	25.3 ± 2.9	41.2 ± 1.4	(5.93 ± 2.40) × 10 ⁻⁶	(1.74 ± 0.24) × 10 ⁻⁵
Ch ⁺	31.24 ± 0.76	26.96 ± 0.90	(3.86 ± 0.98) × 10 ⁻⁵	(7.84 ± 1.80) × 10 ⁻⁵
ACh ⁺	34.37 ± 0.61	31.63 ± 0.45	(4.84 ± 0.45) × 10 ⁻⁵	(3.74 ± 0.44) × 10 ⁻⁵

Finalmente se hace un análisis de las constantes de interferencia para el electrodo sin modificar y el electrodo modificado con las NPsAu en donde se observa que la interferencia es menor en el electrodo modificado con las NPsAu, los valores de las constantes se muestran en la Tabla 3.3.

Tabla 3.3. Constantes de interferencia de los iones para cada electrodo

Ion	$-\log K_{ij}^{\text{pot}}$	
	Sin NPsAu	Con NPsAu
Na ⁺	-0.73	-3.39
K ⁺	0.33	-1.23
H ⁺	-1.79	1.06
Ch ⁺	-0.20	0.009

Conclusiones.

El tamaño del radio de los cationes dentro del sistema electroquímico no afecta a la membrana. El aporte de las NPsAu sobre el electrodo, se ve en que separa de forma más efectiva las señales de los iones interferentes ante el ion ACh⁺.

3.5. OPTIMIZACIÓN DEL TIEMPO DE ACONDICIONAMIENTO DEL ELECTRODO.

Reactivos

Se utilizaron reactivos de grado analítico. (NaTPB) Tetrafenil borato de sodio, (NPE) Nitrofenil pentil éter, (THT) tetrahidrofurano, (PVC) policloruro de vinilo de alto peso molecular, (Ch) Cloruro de Colina y (ACh) Cloruro de Acetilcolina de la marca Sigma-Aldrich. Se preparó una solución de ACh 0.1M y diluciones que van desde 1×10^{-1} hasta 1×10^{-6} M con agua destilada y desionizada a 18.2Ω obtenida de un equipo Milli-Pore.

Para la preparación de la membrana se continua con la metodología ya descrita y se utilizan electrodos tipo composite previamente contruidos.

Sistema Electroquímico

Los estudios potenciométricos se llevaron a cabo condiciones constantes de temperatura y agitación, en una celda electroquímica utilizando un electrodo de referencia de Ag/AgCl_{sat} y el electrodo de trabajo construido. Los electrodos fueron previamente acondicionados sumergiéndolos en una solución de Acetilcolina (ACh) 0.1×10^{-4} M, variando

el tiempo de acondicionamiento según se muestra en la tabla 3.4. Para cada estudio se usó un sistema electroquímico nuevo y se hicieron siete repeticiones con el mismo electrodo para observar su reproducibilidad.

Tabla 3.4 *Tiempos de acondicionamiento para cada electrodo*

Tiempo (min)	Electrodo
0	1
5	2
10	3
15	4
20	5
30	6

Resultados y Discusión

En la Figura 3.8 se muestra la gráfica de la curva de calibración del electrodo 1, (sin acondicionar), las barras nos señalan la desviación estándar que existe entre las repeticiones llevadas a cabo con el mismo electrodo. En la Tabla 3.5 se muestran los valores de las pendientes y el límite de detección correspondientes a la curva de calibración, en donde se observan cambios en la pendiente conforme se llevaron a cabo las repeticiones, obteniendo un promedio de 31.34 ± 0.88 para la mV/ década pendiente clasificándose como sub-Nernstiano y $7.4 \times 10^{-5} \pm 0.1$ mol/L para su límite de detección.

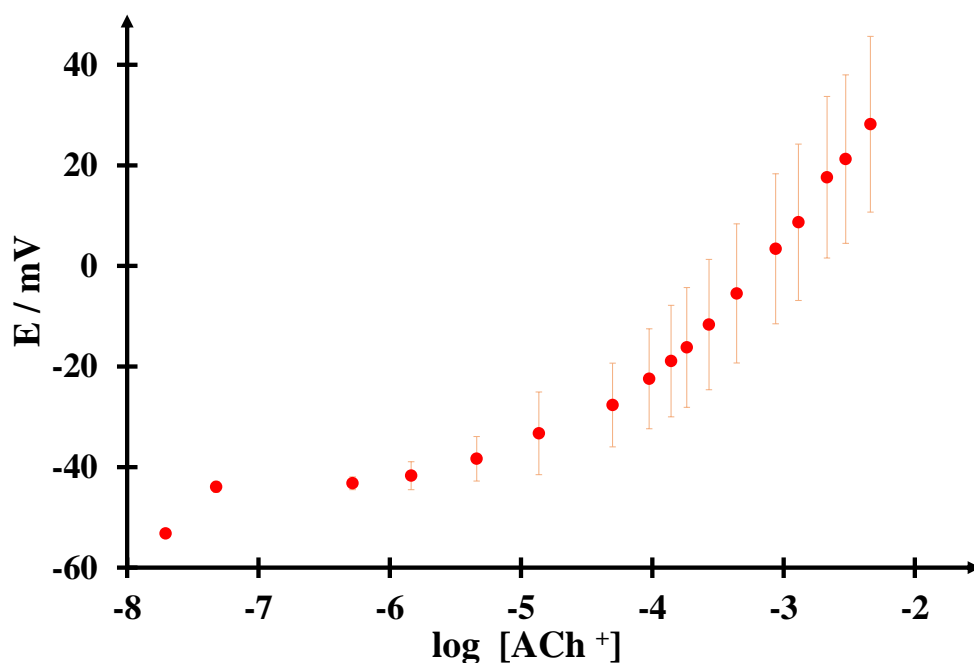


Figura 3.8. Curva de calibración para el electrodo 1 sin acondicionar y como analito ACh⁺.

Tabla 3.5. Muestra los valores de los parámetros analíticos para el electrodo 1.

Electrodo 1		
Tiempo de acondicionado 0 mín.		
Repetición	$m / \text{mV década}^{-1}$	LD / mol L^{-1}
1	36.50 ± 0.81	$(5.43 \pm 3.0) \times 10^{-5}$
2	33.14 ± 0.60	$(4.40 \pm 3.5) \times 10^{-5}$
3	31.68 ± 0.77	$(5.84 \pm 0.2) \times 10^{-5}$
4	30.87 ± 0.81	$(5.25 \pm 2.0) \times 10^{-5}$
5	30.80 ± 0.35	$(4.03 \pm 4.1) \times 10^{-5}$
6	30.49 ± 1.80	$(5.83 \pm 2.9) \times 10^{-5}$
7	25.89 ± 1.01	$(2.12 \pm 3.5) \times 10^{-4}$

La Figura 3.9 muestra el comportamiento de las curvas de calibración del electrodo 2, (acondicionado durante 5 minutos) en donde se observa que en la zona de linealidad el electrodo responde ante el aumento de la concentración de la ACh⁺. Realizando una regresión lineal de esta zona podemos obtener los parámetros analíticos de cada repetición, los cuales se muestran en la Tabla 3.6, notando un promedio de pendiente de $36.44 \pm 0.67 \text{ mV/ década}$ y $3.1 \times 10^{-5} \pm 3.1 \times 10^{-5} \text{ mol/L}$ para el límite de detección.

Tabla 3.6. Muestra los valores de los *parámetros analíticos para el electrodo 2*.

Electrodo 2		
Tiempo de acondicionado 5 min.		
Repetición	$m / \text{mV década}^{-1}$	$LD / \text{mol L}^{-1}$
1	41.45 ± 0.68	$(2.38 \pm 0.51) \times 10^{-5}$
2	38.14 ± 0.57	$(1.76 \pm 0.47) \times 10^{-5}$
3	37.78 ± 1.11	$(2.59 \pm 0.75) \times 10^{-5}$
4	35.20 ± 0.91	$(2.90 \pm 0.96) \times 10^{-5}$
5	35.51 ± 0.59	$(4.08 \pm 1.10) \times 10^{-5}$
6	33.05 ± 0.55	$(3.94 \pm 0.17) \times 10^{-5}$
7	33.96 ± 0.31	$(4.09 \pm 0.84) \times 10^{-5}$

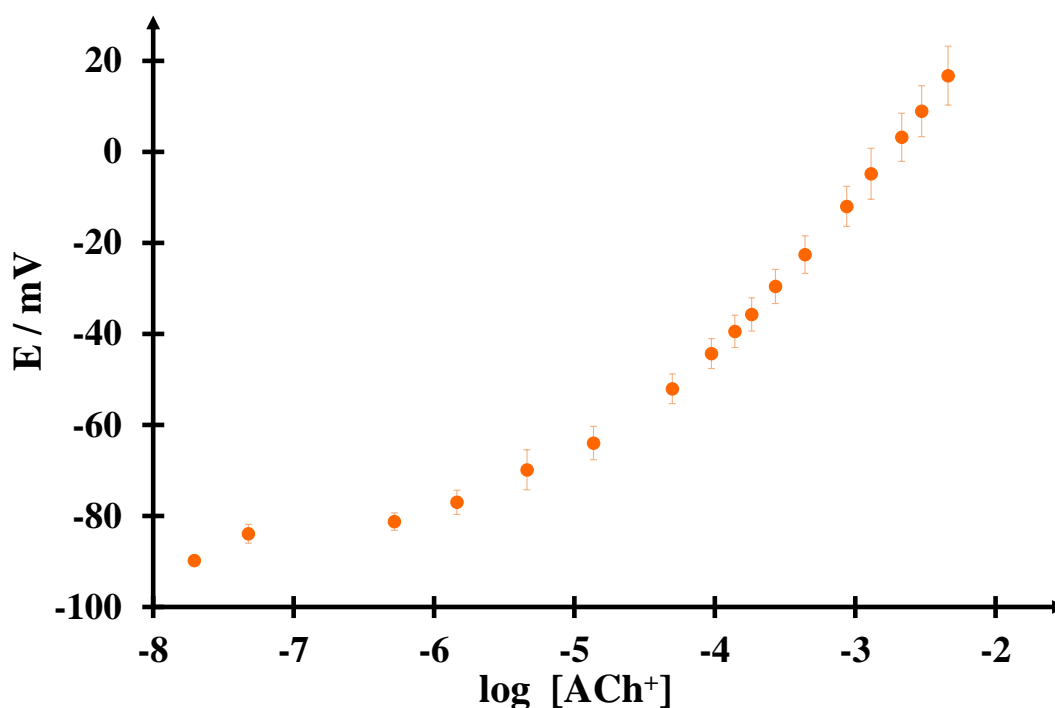


Figura 3.9. Curva de calibración para el electrodo 2 acondicionado durante 5 minutos.

La Figura 3.10 muestra el comportamiento de las curvas de calibración del electrodo 3, (acondicionado durante 10 minutos) en donde se observa inicialmente un aumento de potencial muy pequeño conforme aumenta la concentración de la ACh, sin embargo, se observa una zona de linealidad en donde la respuesta del electrodo es mayor ante la concentración del analito. Con los datos obtenidos de cada repetición se calcularon los parámetros analíticos

mostrados en la Tabla 3.7 en la cual se obtiene una pendiente promedio de 39.06 ± 0.73 mV/década y el límite de detección en $4.1 \times 10^{-5} \pm 2.9 \times 10^{-5}$ mol/L.

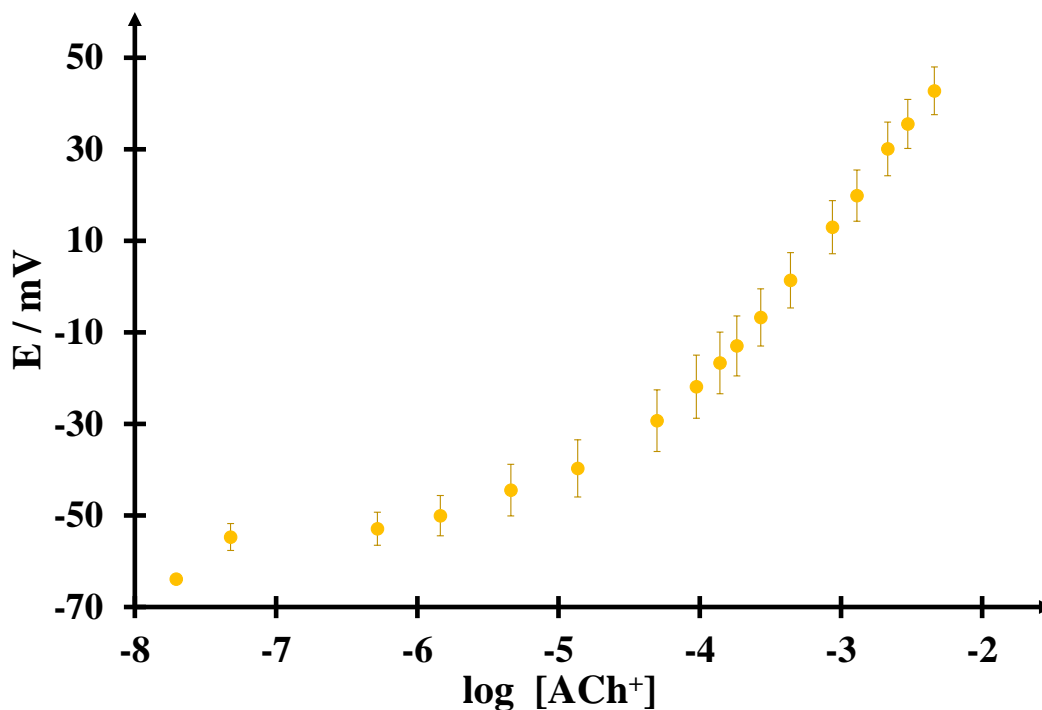


Figura 3.10. Curva de calibración para el electrodo 3 acondicionado durante 10 minutos.

Tabla 3.7. Muestra los valores de los parámetros analíticos para el electrodo 3.

Electrodo 3		
Tiempo de acondicionado 10 mín.		
Repetición	m / mV década ⁻¹	LD / mol L ⁻¹
1	41.70 ± 0.94	$(4.03 \pm 1.7) \times 10^{-5}$
2	37.53 ± 0.55	$(3.82 \pm 1.5) \times 10^{-5}$
3	34.94 ± 0.40	$(4.25 \pm 2.5) \times 10^{-5}$
4	36.93 ± 0.53	$(4.06 \pm 0.6) \times 10^{-5}$
5	41.73 ± 1.40	$(4.30 \pm 2.8) \times 10^{-5}$
6	40.81 ± 0.67	$(4.33 \pm 1.3) \times 10^{-5}$
7	39.80 ± 0.63	$(4.22 \pm 3.7) \times 10^{-5}$

En la Figura 3.11 se observa el comportamiento de las curvas de calibración del electrodo 4, (acondicionado durante 15 minutos) las cuales indican que en la zona de linealidad existe un aumento del potencial conforme aumenta la concentración de ACh. Con el objetivo de verificar

el comportamiento del electrodo se calcularon los parámetros analíticos mostrados en la Tabla 3.8, obteniendo en promedio, una pendiente de 36.73 ± 1.06 mV/ década y un límite de detección de $6.8 \times 10^{-6} \pm 9 \times 10^{-6}$ mol /L.

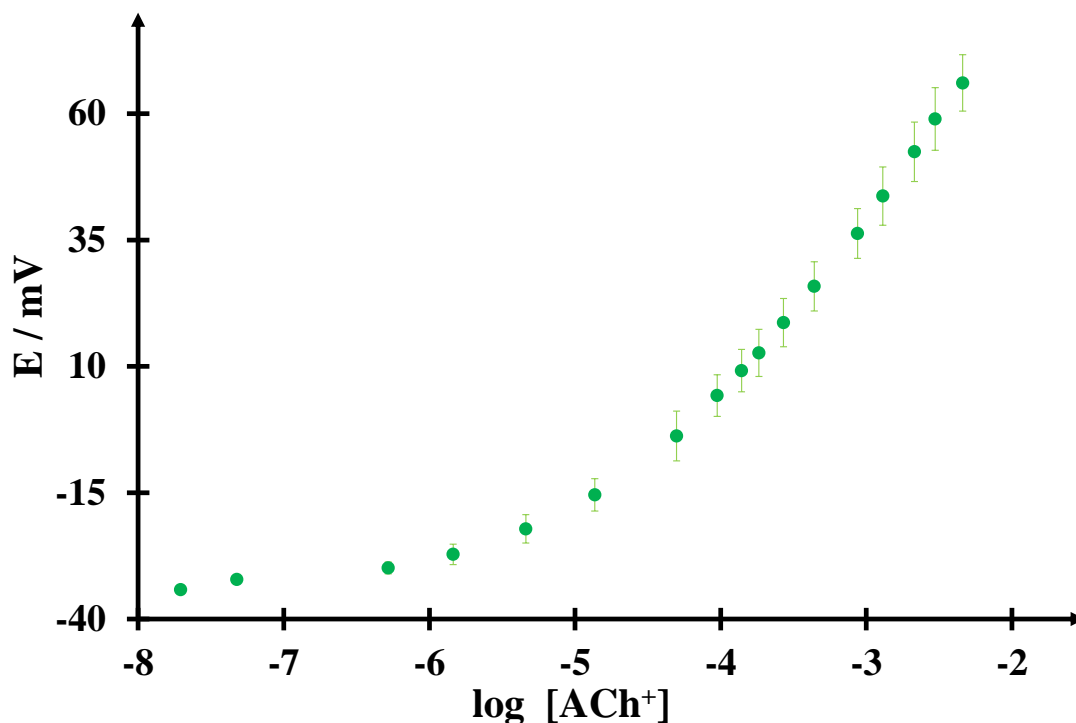


Figura 3.11. Curva de calibración para el electrodo 4 acondicionado durante 15 minutos.

Tabla 3.8. Muestra los valores de los parámetros analíticos para el electrodo 4.

Electrodo 4		
Tiempo de acondicionado 15 mín.		
Repetición	$m / mV \text{ década}^{-1}$	LD / mol L ⁻¹
1	39.23 ± 1.4	$(1.45 \pm 0.57) \times 10^{-5}$
2	37.77 ± 0.86	$(3.66 \pm 0.51) \times 10^{-6}$
3	40.47 ± 1.8	$(7.68 \pm 2.20) \times 10^{-6}$
4	33.72 ± 0.69	$(5.02 \pm 4.50) \times 10^{-6}$
5	34.92 ± 0.51	$(6.02 \pm 0.17) \times 10^{-6}$
6	34.91 ± 0.80	$(3.89 \pm 1.60) \times 10^{-6}$
7	36.13 ± 1.3	$(7.17 \pm 0.20) \times 10^{-6}$

Posteriormente se procede a probar el electrodo 5 con un tiempo de acondicionamiento correspondiente a 20 minutos, en la Figura 3.12 se observa que en la zona de linealidad el potencial aumenta conforme aumenta la concentración de ACh⁺. Con estos datos se obtiene

los parámetros analíticos para cada repetición, que se muestran en la Tabla 3.9, presentando una pendiente promedio de 29.80 ± 0.65 mV/ década y el límite de detección se muestra en $3.0 \times 10^{-5} \pm 7.8 \times 10^{-5}$ mol/L.

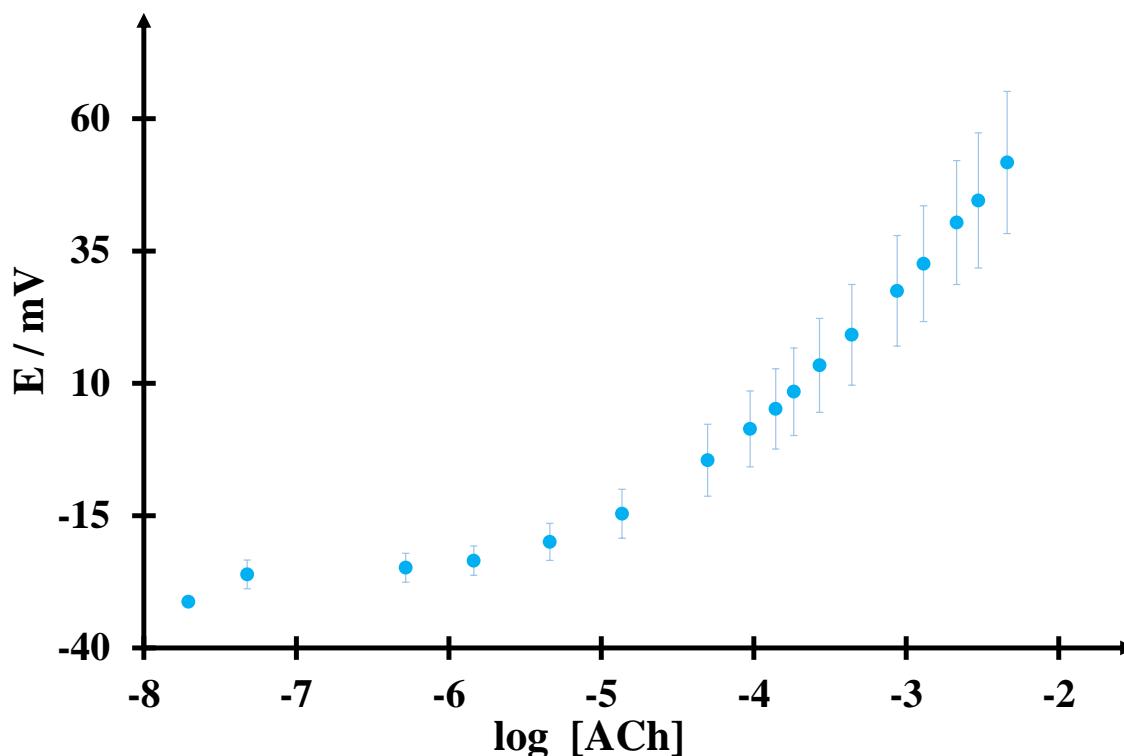


Figura 3.12. Curva de calibración para el electrodo 5 acondicionado durante 20 minutos.

Tabla 3.9. Muestra los valores de los parámetros analíticos para el electrodo 5.

Electrodo 5		
Tiempo de acondicionado 20 mín.		
Repetición	m / mV década ⁻¹	LD / mol L ⁻¹
1	31.02 ± 0.65	$(2.80 \pm 0.61) \times 10^{-5}$
2	38.94 ± 0.69	$(2.20 \pm 1.17) \times 10^{-5}$
3	29.19 ± 0.62	$(2.45 \pm 1.19) \times 10^{-5}$
4	26.60 ± 0.68	$(2.07 \pm 0.48) \times 10^{-5}$
5	27.69 ± 0.61	$(3.20 \pm 0.57) \times 10^{-5}$
6	27.87 ± 0.67	$(4.11 \pm 0.47) \times 10^{-4}$
7	27.30 ± 0.59	$(4.10 \pm 2.16) \times 10^{-5}$

Finalmente se muestra en la Figura 3.13 el comportamiento del electrodo acondicionado durante 30 minutos en el cual las curvas de calibración indican que en la zona de linealidad si

la concentración de ACh aumenta, también aumenta el potencial. Con los datos obtenidos de las curvas anteriores se obtienen los parámetros analíticos mostrados en la Tabla 3.10, en los cuales se alcanza una pendiente promedio de 34.50 ± 0.64 mV/década y un límite de detección de $2.8 \times 10^{-5} \pm 9.8 \times 10^{-6}$ mol/L.

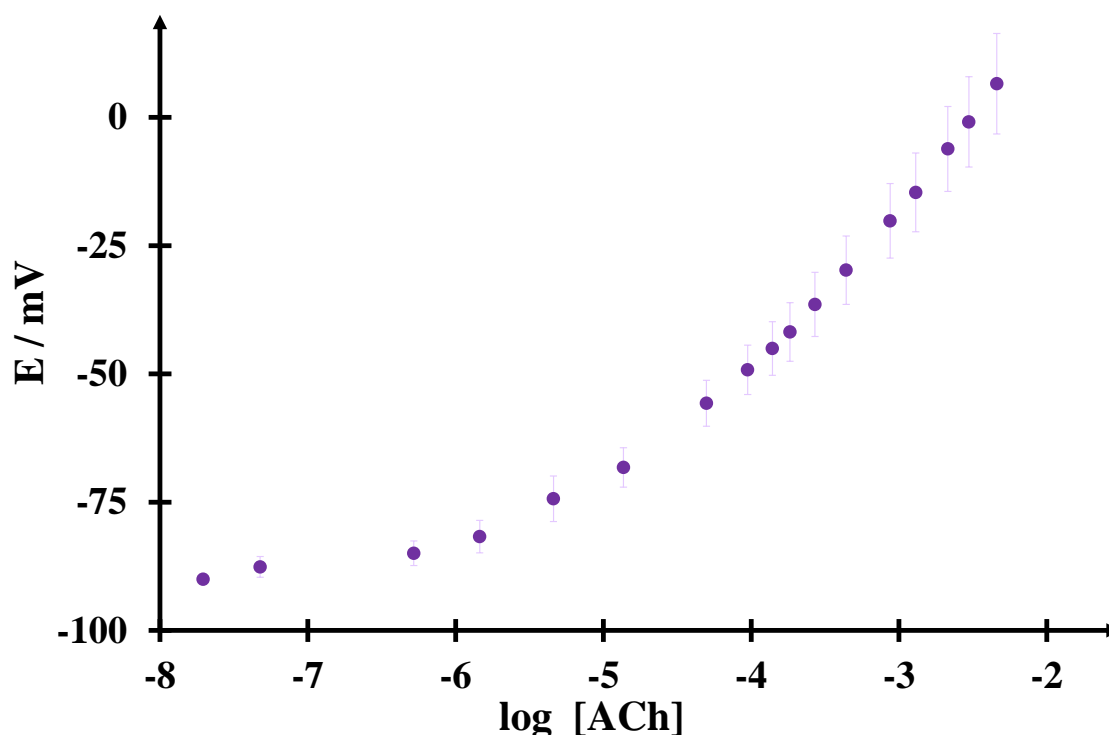


Figura 3.13. Curva de calibración para el electrodo 6 acondicionado durante 30 minutos.

Tabla 3.10 Muestra los valores de los parámetros analíticos para el electrodo 6.

Electrodo 6		
Tiempo de acondicionado 30 mín.		
Repetición	$m / \text{mV década}^{-1}$	LD / mol L^{-1}
1	38.29 ± 0.88	$(1.88 \pm 0.49) \times 10^{-5}$
2	39.44 ± 0.74	$(1.70 \pm 0.41) \times 10^{-5}$
3	34.20 ± 0.46	$(2.00 \pm 0.50) \times 10^{-5}$
4	33.22 ± 0.45	$(2.37 \pm 0.78) \times 10^{-5}$
5	32.39 ± 0.49	$(2.24 \pm 0.79) \times 10^{-5}$
6	32.45 ± 0.74	$(4.12 \pm 1.06) \times 10^{-5}$
7	31.53 ± 0.71	$(5.10 \pm 2.79) \times 10^{-5}$

En la Tabla 3.11 se muestra el promedio de los parámetros analíticos de cada electrodo acondicionado a diferentes tiempos, aquí se advierte que todos los electrodos presentan una pendiente con comportamiento sub Nernstiano, sin embargo, el electrodo que se acondicionó durante 15 minutos presenta un límite de detección menor a los demás.

Tabla 3.5 Muestra el valor del promedio de los parámetros analíticos para cada electrodo.

Parámetros de detección		
t / min	m / mV década ⁻¹	LD / mol L ⁻¹
0	31.34 ± 0.88	(7.40 ± 1.02) x10 ⁻⁴
5	36.44 ± 0.67	(1.64 ± 0.70) x10 ⁻⁵
10	39.06 ± 0.73	(4.11 ± 0.29) x10 ⁻⁵
15	36.73 ± 1.06	(6.80 ± .90) x10 ⁻⁶
20	29.80 ± 0.65	(1.71 ± 0.53) x10 ⁻⁵
30	34.50 ± 0.64	(2.80 ± 0.98) x10 ⁻⁵

Comparando los diferentes tiempos y la desviación estándar para cada electrodo, no existe una tendencia clara que relacione los parámetros analíticos con el tiempo de acondicionamiento, es decir, las pendientes se mantienen dentro de un intervalo de entre 30 y 36 mv/década aproximadamente, manteniendo un comportamiento Sub-Nernstiano, lo que indica que el tiempo de acondicionamiento del ISE afecta muy poco la sensibilidad del electrodo y el límite de detección, el cual se mantiene en un intervalo de 3×10^{-5} a 7×10^{-5} , sin embargo, electrodo que se acondicionó durante 15 minutos muestra un incremento en su límite de detección presentándose en 6.8×10^{-6} . En general, esto nos sugiere que el tiempo de acondicionamiento del electrodo, en el rango de 0 a 30 minutos, modifica escasamente sus parámetros de detección, no obstante, sus intervalos de incertidumbre nos indican que los electrodos con tiempos de acondicionamiento de 5, 10, 15 y 30 minutos son reproducibles mientras que los de 0 y 20 minutos son poco reproducibles.

Conclusiones.

En base a los resultados obtenidos se observa que el tiempo de acondicionamiento del electrodo no es un factor que altere considerablemente la respuesta del debido a que los

parámetros analíticos no cambian mucho de un tiempo al otro, sin embargo, si se nota una mejora en la reproducibilidad del mismo siendo electrodo acondicionado durante 15 minutos el que muestra un límite de detección mayor y buena reproducibilidad.

3.6 RESPUESTA DEL ISE VARIANDO EL PORCENTAJE EN PESO DE LAS NPsAu.

Preparación de los electrodos tipo Composite con NPsAu

Los electrodos modificados con las NPsAu se construyeron con la misma metodología mezclando grafito en polvo, Araldit como resina epóxica y endurecedor, agregando diferentes concentraciones en peso de NPsAu previamente sintetizadas en el Laboratorio Interdisciplinario de Electroquímica e Ingeniería de materiales (LIEIM) en la Universidad Autónoma Metropolitana unidad Azcapotzalco, como se muestra en la Tabla 3.6, hasta obtener una pasta homogénea, posteriormente se deposita en tubo de PVC de 7mm de diámetro aproximadamente, en el cual se encuentra un contacto sólido de cobre unido a un conector previamente soldado como se muestra en la Figura 3.6 que sirve como conductor y soporte de la mezcla. El dispositivo se deja curar por 24 horas a 40 °C.

Tabla 3.12. *Porcentaje en peso de NPsAu añadidas a la mezcla.*

Electrodo	NPsAu
A	1%
B	5%
C	10%

A continuación se muestra en la Figura 3.14 las curvas de calibración correspondientes al electrodo modificado con el 1% en peso de NPsAu, en donde se observa claramente un aumento del potencial conforme aumenta la concentración de los iones. Además, se advierte de la señal de la Ch^+ no interfiere y es menor que la de la ACh^+ .

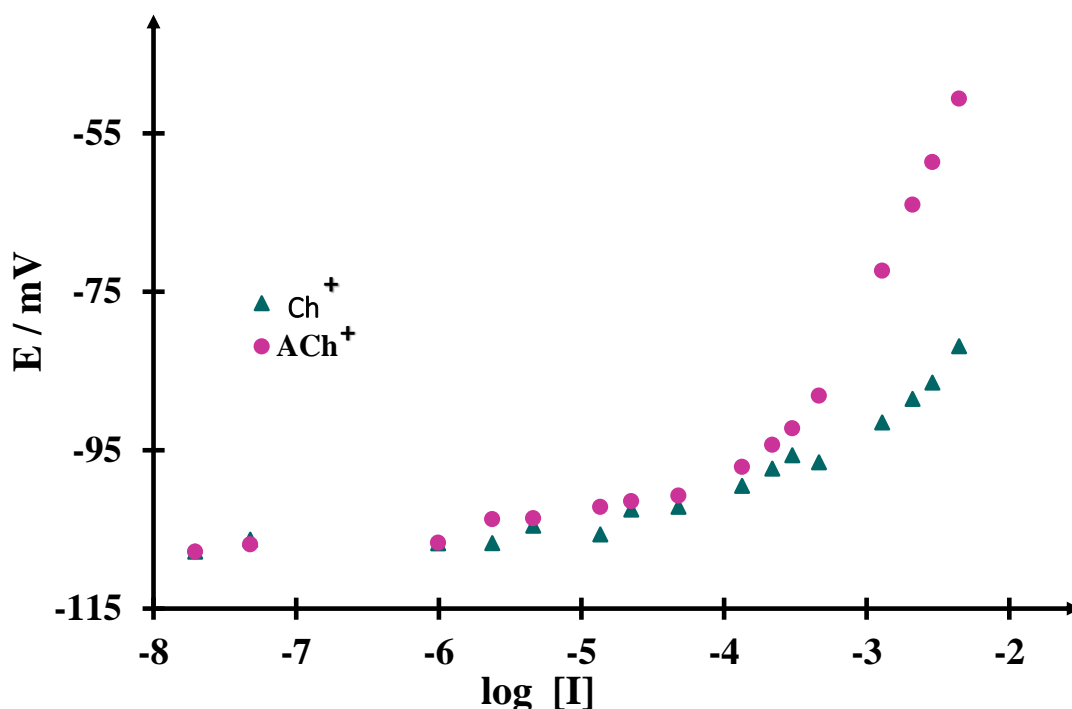


Figura 3.14. Curva de calibración para la ACh⁺ y Ch⁺ con un electrodo modificado con NPsAu al 1% en peso y una membrana compuesta por PVC al 33.2% como matriz, NPPE al 0.5% como plastificante y NaTPB al 66.3% como ionóforo.

En la Tabla 3.7 se muestran los valores de los parámetros analíticos para las curvas de la Figura 3.14 en donde se advierte que con respecto a la pendiente del electrodo sin modificar esta aumenta de 21.52 ± 2.04 mV/década a 31.57 ± 1.89 mV/década, lo que indica que el uso de las NPsAu si afecta a el comportamiento del electrodo ante la señal de la ACh.

Tabla 3.13. Muestra los valores de los parámetros analíticos para el electrodo modificado con NPsAu al 1% en peso.

NPsAu 1%		
Ion	$m / \text{mV década}^{-1}$	LD / mol L^{-1}
Ch ⁺	8.63 ± 0.85	$(1.61 \pm 0.24) \times 10^{-5}$
ACh ⁺	31.57 ± 1.89	$(1.25 \pm 0.72) \times 10^{-4}$

La Figura 3.15 muestra las curvas de calibración correspondientes al electrodo modificado con el 5% en peso de NPsAu, en donde se observa nuevamente un aumento del potencial conforme aumenta la concentración de los iones. Para el caso de la Ch la fluctuación de la señal nos indica que probablemente el electrodo aún no se había estabilizado por completo, sin embargo sí se

advierte de la señal de la Ch^+ no interfiere en la zona de linealidad y es menor que la de la ACh^+ .

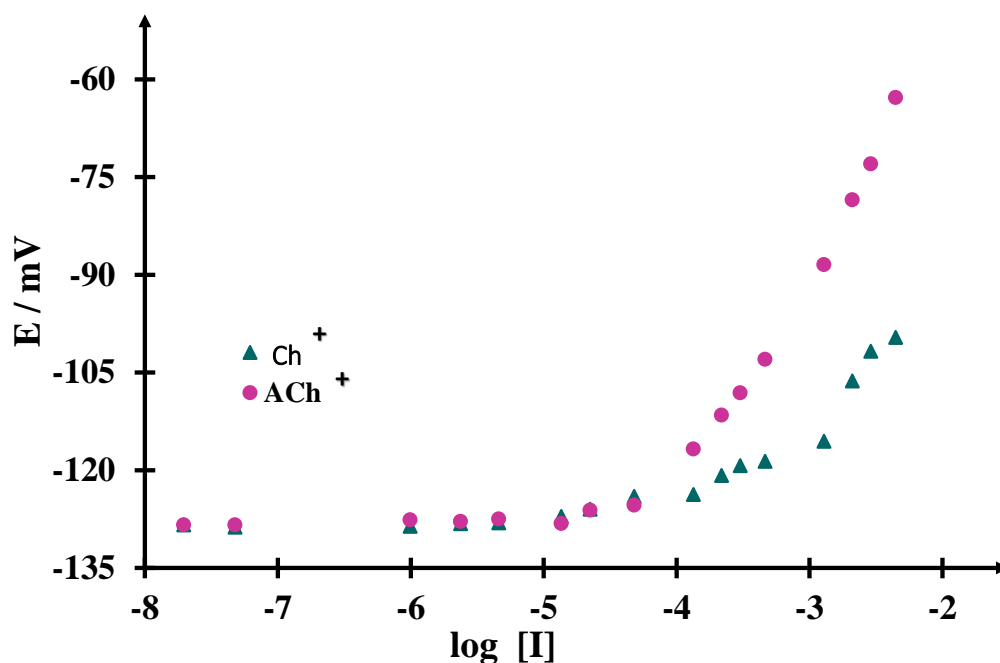


Figura 3.15. Curva de calibración para la ACh^+ y Ch^+ con un electrodo modificado con NPsAu al 5% en peso y una membrana compuesta por PVC al 33.2% como matriz, NPPE al 0.5% como plastificante y NaTPB al 66.3% como ionóforo.

En la Tabla 3.14 se muestran los valores de los parámetros analíticos para las curvas de la Figura 3.15 en donde se advierte que con respecto a la pendiente del electrodo sin modificar esta aumenta de 21.52 ± 2.04 mV/década a 31.99 ± 1.89 mV/década, lo que indica que el uso de las NPsAu si afecta a el comportamiento del electrodo ante la señal de la ACh, no obstante, la diferencia con el electrodo modificado al 1% es despreciable.

Tabla 3.14. Muestra los valores de los parámetros analíticos para el electrodo modificado con NPsAu al 5% en peso.

Membrana 2 NPsAu 5%		
Ion	$m / \text{mV década}^{-1}$	LD / mol L^{-1}
Ch^+	15.74 ± 1.92	$(8.96 \pm 0.65) \times 10^{-5}$
ACh^+	31.99 ± 1.93	$(6.27 \pm 0.56) \times 10^{-5}$

La Figura 3.16 muestra las curvas de calibración correspondientes al electrodo modificado con el 10% en peso de NPsAu, en donde análogamente a los electrodos modificados con NPsAu al 1 y 10 %, se advierte en la zona lineal un aumento del potencial conforme aumenta la

concentración de los iones. En este caso de la señal obtenida de la Ch^+ no interfiere en la zona de linealidad y también es menor que la de la ACh^+ .

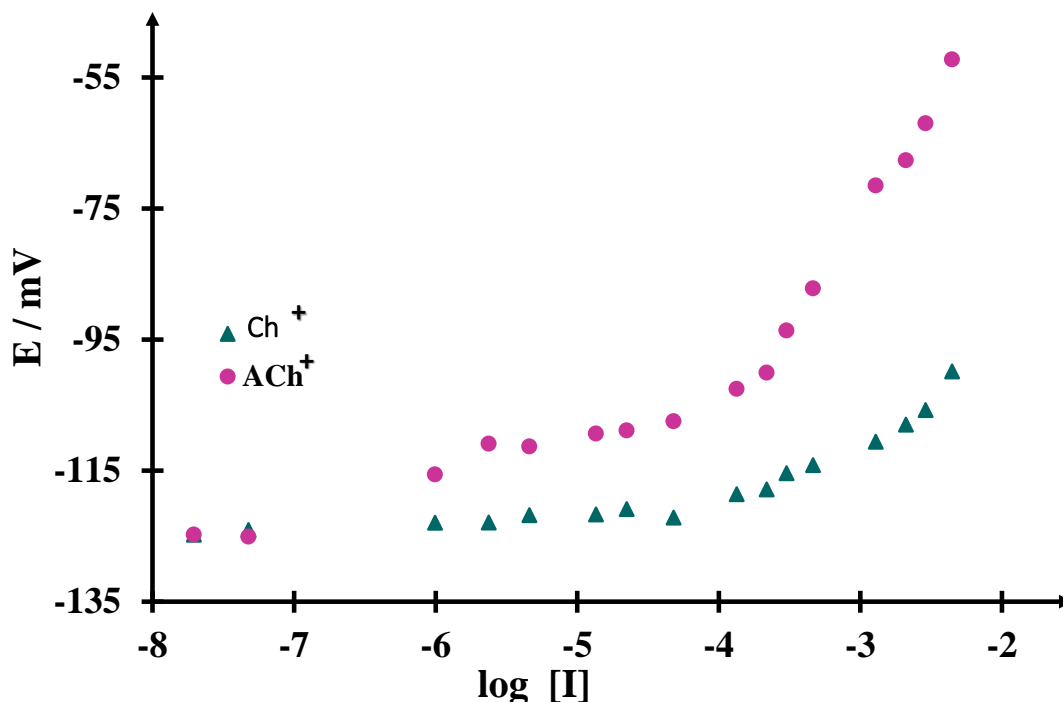


Figura 3.16. Curva de calibración para la ACh^+ y Ch^+ con un electrodo modificado con NPsAu al 10% en peso y una membrana compuesta por PVC al 33.2% como matriz, NPPE al 0.5% como plastificante y NaTPB al 66.3% como ionóforo.

En la Tabla 3.15 se muestran los valores de los parámetros analíticos para las curvas de la Figura 3.16 en donde se advierte que con respecto a la pendiente del electrodo sin modificar esta aumenta de 21.52 ± 2.04 mV/década a 33.00 ± 1.32 mV/década, lo que indica que el uso de las NPsAu si afecta a el comportamiento del electrodo ante la señal de la ACh , no obstante la diferencia con el electrodo modificado al 1% es despreciable.

Tabla 3.15. Muestra los valores de los parámetros analíticos para el electrodo modificado con NPsAu al 10% en peso.

Membrana 2 NPsAu 10%		
Ion	m / mV década ⁻¹	LD / mol L ⁻¹
Ch^+	11.12 ± 1.12	$(1.10 \pm 0.22) \times 10^{-4}$
ACh^+	33.00 ± 1.32	$(1.52 \pm 0.51) \times 10^{-4}$

Conclusiones.

Con base en los resultados obtenidos se puede afirmar que el uso de las NPsAu aumenta la señal de la ACh proporcionándole a la membrana mayor sensibilidad ante el analito de interés, ya que el límite de detección es más bajo que con el electrodo sin modificar. Comparando las señales con el porcentaje de NPsAu utilizadas, la pendiente entre estos electrodos varia muy poco por lo que no afecta la cantidad en peso de NPsAu.

CAPÍTULO 4

MECANISMO DE REACCIÓN Y CINÉTICA DE LA ACETILCOLINESTERASA

Para medir la velocidad de una reacción, es necesario seguir una señal que nos indique la formación del producto o el agotamiento del sustrato a lo largo del tiempo. Este tipo de señal varía de un ensayo a otro, pero generalmente, la mayoría de los ensayos enzimáticos se basan en una o más de las siguientes clases amplias de métodos de detección y separación para seguir el curso de la reacción como lo son la espectroscopia, polarografía, desintegración radioactiva, separación electroforética y separación cromatográfica. Estos métodos se pueden utilizar en el ensayo directo, es decir, la medición directa de la concentración de sustrato o producto como una función del tiempo, por otro lado, en algunos casos, el sustrato y el producto de una reacción enzimática no proporcionan una señal distinta para la medición de sus concentraciones, sin embargo, la generación del producto puede acoplarse a otra reacción no enzimática que produce una señal conveniente; tal estrategia se conoce como un ensayo indirecto[32].

4.1. LA ACETILCOLINAESTERASA.

La acetilcolinesterasa (AChE) es una enzima importante presente en las hendiduras sinápticas del sistema nervioso central de los organismos vivos, es la encargada de catalizar la hidrólisis de la ACh mostrada en la Figura 4.1, esta reacción que se da en el organismo facilita el correcto funcionamiento del sistema muscular. El principal papel de la AChE incluye la transmisión de los impulsos nerviosos a las sinapsis colinérgicas, relacionadas con la memoria, por lo tanto está íntimamente relacionada con la enfermedad de Alzheimer[42]. Así la función

normal de la ACh depende de su rápida hidrólisis por la AChE lo cual permite la brevedad y unidad de los impulsos propagados sincrónicamente. El ácido acético liberado pasa a la sangre, mientras que la colina es recuperada por las neuronas para la síntesis de nuevas moléculas de neurotransmisor[43].

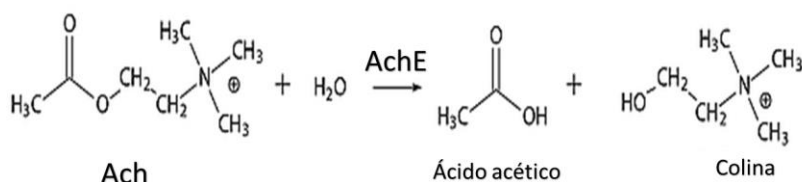


Figura 4.1. Reacción de hidrólisis de la ACh catalizada por la AChE.

Una de las características de la AChE es que cuenta con varios sitios activos secundarios como se muestra en la Figura 4.2: el sitio aniónico, con el cual interactúa el resto de colina de ACh; el sitio esteático, que contiene los tres residuos de la tríada catalítica; el orificio de oxianión y el bolsillo de acilo, que confiere especificidad de sustrato.[34].

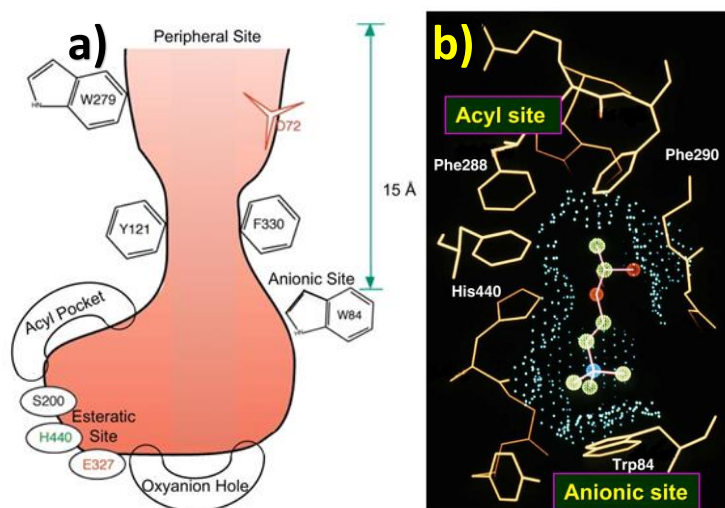


Figura 4.2. a) Vista esquemática de la garganta del sitio activo de la AChE. b) Modelo de ACh unido en el sitio activo de AChE [34].

Sin embargo, es relevante saber de qué forma interactúan los sitios activos de la AChE con la Ch, para esto a continuación se muestra el mecanismo de reacción de la misma.

4.1.1 MECANISMO DE REACCIÓN DE LA AChE.

La Figura 4.3 es una representación gráfica de la hidrólisis de la ACh, mediante la enzima AChE y su interacción con los sitios activos de la misma, en donde se observa que la estructura de la AChE cuenta con dos sitios activos, el primero está dotado con una carga negativa siendo un sitio de interacción electrostática, mientras que al segundo se le conoce como sitio esterásico donde se encuentra el -OH de la serina. Estos sitios interaccionan con la Ch formando el complejo Enzima-acetilcolina para posteriormente dejar a la enzima acetilada y finalmente obtener los productos que son el Ácido acético y la Colina [44].

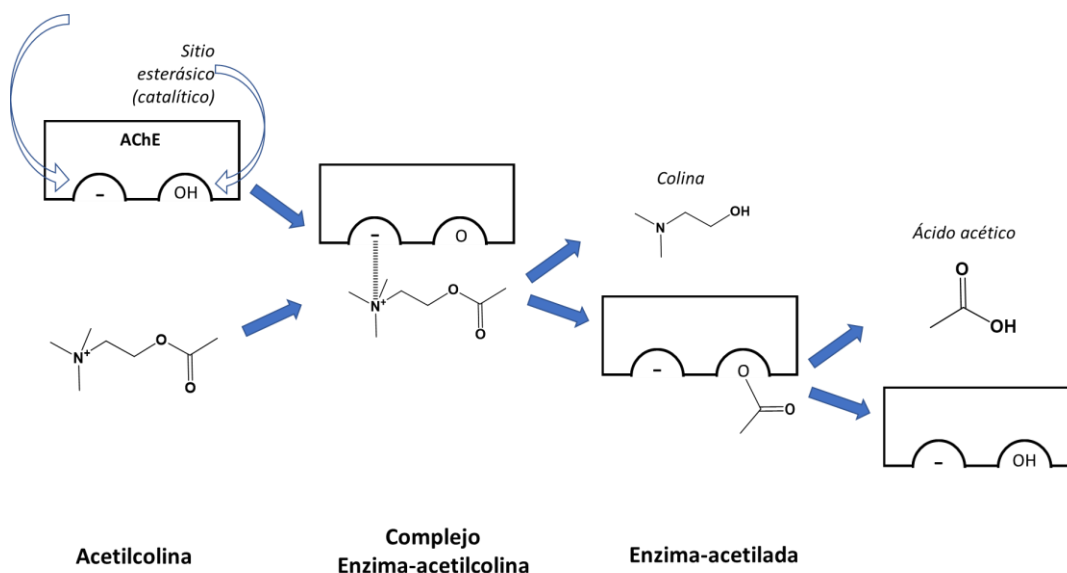


Figura 4.3. Representación gráfica del mecanismo de reacción de la ACh con la AChE.

Por otra parte, el hecho de que las enzimas fueran tan buenos catalizadores fue atractivo para los científicos quienes deseaban saber cómo se llevaba a cabo esta cinética. Esto ha dado como resultado que actualmente se utilice la cinética de las enzimas para conocer su actividad.

4.2. VELOCIDAD DE REACCIÓN ENZIMÁTICA.

La cinética enzimática muestra que las velocidades de reacción de las enzimas dependen de las condiciones de la solución y de la concentración de sustrato [32] [33]. Aquellas condiciones que desnaturalizan una proteína, como temperaturas elevadas, valores extremos

de pH o altas concentraciones de sal, dificultan o impiden la actividad enzimática, mientras que elevadas concentraciones de sustrato tienden a incrementar la actividad [14].

Debido a la presencia de los sitios activos en la enzima, sabemos que la velocidad aumenta a medida que aumenta la concentración de sustrato, hasta que la enzima (E) se satura. En la Figura 4.4 se observa que la saturación ocurre porque, cuando la concentración de sustrato aumenta, disminuye la concentración de enzima libre, que se convierte en la forma ES y propicia la formación del producto (P).

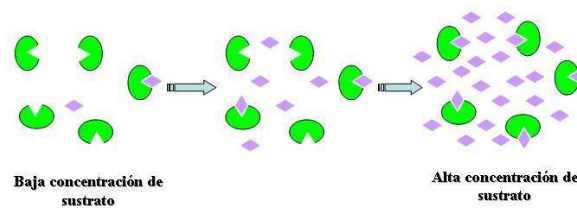


Figura 4.4. Esquema de saturación de la enzima debido al aumento en la concentración de sustrato.

Cuando se alcanza la velocidad máxima ($V_{\text{máx}}$) de la reacción enzimática, todos los sitios activos de la enzima tienen sustrato unido, y la cantidad de complejos ES, es igual a la cantidad total de enzima, esta es una de los parámetros considerado en la definición de la ecuación de Michaelis-Menten (Ecuación 4.1) donde se considera que la velocidad de reacción está dada en términos de la concentración de sustrato ($[S]$), la velocidad máxima y la constante de Michaelis-Menten es decir la concentración media de saturación[45].

$$V_0 = \frac{V_{\text{máx}}[S]}{K_m + [S]} \quad (4.1)$$

En la Figura 4.5 es posible observar de manera gráfica como al aumentar la concentración de sustrato y llegar a la saturación de la solución, la velocidad alcanza un valor máximo.

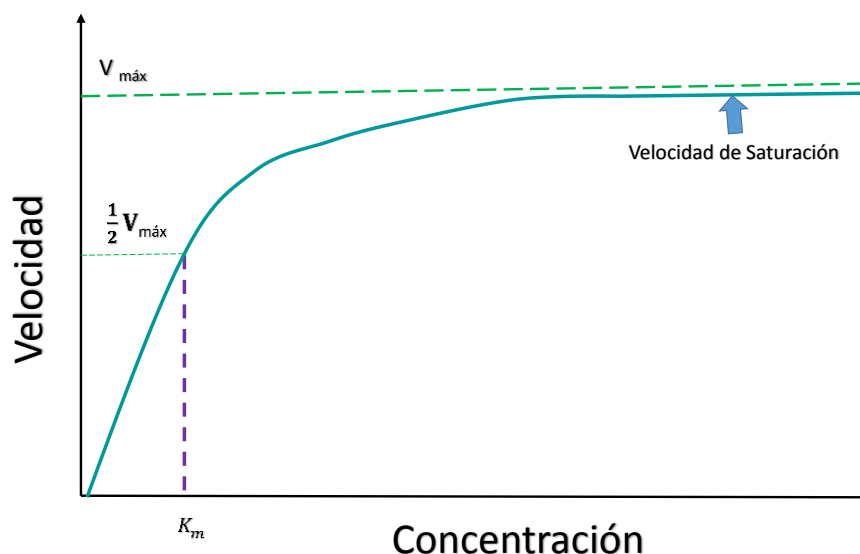


Figura 4.5. Representación gráfica de la velocidad de una reacción enzimática donde se puede observar los parámetros básicos de la ecuación de Michaelis-Menten.

4.3 CINÉTICA DE LA REACCIÓN DE LA AChE CON EL ISE.

Con el objetivo de demostrar que la reacción de la AChE se lleva a cabo dentro del sistema Bio-electroquímico se llevaron a cabo potenciometrías utilizando el electrodo ISE previamente construido y modificado con NPsAu, acondicionado durante 15 minutos como electrodo de trabajo y un electrodo de $\text{Ag}/\text{AgCl}_{\text{sat}}$ como electrodo de referencia, agregando diferentes concentraciones de ACh que van desde 7×10^{-06} hasta 5×10^{-3} M en una celda electroquímica a temperatura y agitación constante de 20°C y 400 rpm respectivamente. Como electrolito soporte se utilizó buffer de fosfatos pH 7 y para estudio se utilizaron disoluciones de ACh a diferentes concentraciones y AChE 0.4 unidades/mL.

Resultados.

En la figura 4.6 se observa la respuesta del ISE ante la acción de la AChE en el sistema bio-electroquímico, primero se advierte un aumento de potencial cuando se agrega la ACh, posteriormente el potencial se mantiene constante indicando que se ha estabilizado el ISE,

finalmente se agrega AChE 0.4 unidades/mL lo que provoca una disminución del potencial señalando que la AChE reacciona con la ACh.

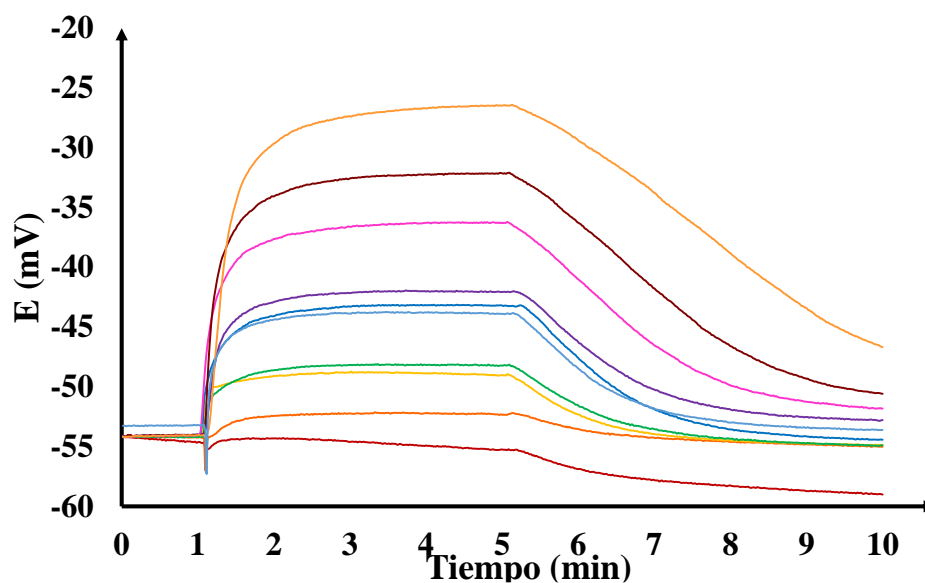


Figura 4.6. Gráfica de potencial versus tiempo donde se observa la acción de la AChE en el sistema.

Conclusiones.

En base a los resultados se puede concluir que utilizando un electrodo ISE construido previamente es posible seguir la reacción de la AChE en un sistema bio-electroquímico, sin embargo no se alcanza a ver con claridad el punto de saturación de la AChE.

CAPÍTULO 5

DETERMINACIÓN DE PESTICIDAS CARBAMATADOS UTILIZANDO UN ISE DE ACETILCOLINA.

Existe una gama de métodos para la detección de los pesticidas carbamatados y muchos de ellos basados en la inhibición de colinesterasas, sin embargo, la mayoría se basa en el uso de sustancias no naturales como la acetiltiocolina, debido a que su estructura le permite ser estudiada por diversas técnicas de detección. En este trabajo nos enfocamos en el desarrollo de un ISE que respondiera a la Acetilcolina.

5.1 MECANISMO DE INHIBICIÓN DE LA AChE EN PRESENCIA DEL PROPOXUR.

En los capítulos anteriores se describió ampliamente la toxicidad de los pesticidas conocidos como inhibidores de la AChE, esta acción tóxica se basa en su capacidad para modificar el residuo de serina presente en uno de los sitios activos de la AChE, en consecuencia, la inhibición de la AChE previene eficazmente la transmisión nerviosa bloqueando la descomposición del neurotransmisor ACh. La Figura 5.1 representa gráficamente este proceso en donde se observa como el pesticida compite con la ACh por los sitios activos de la AChE.

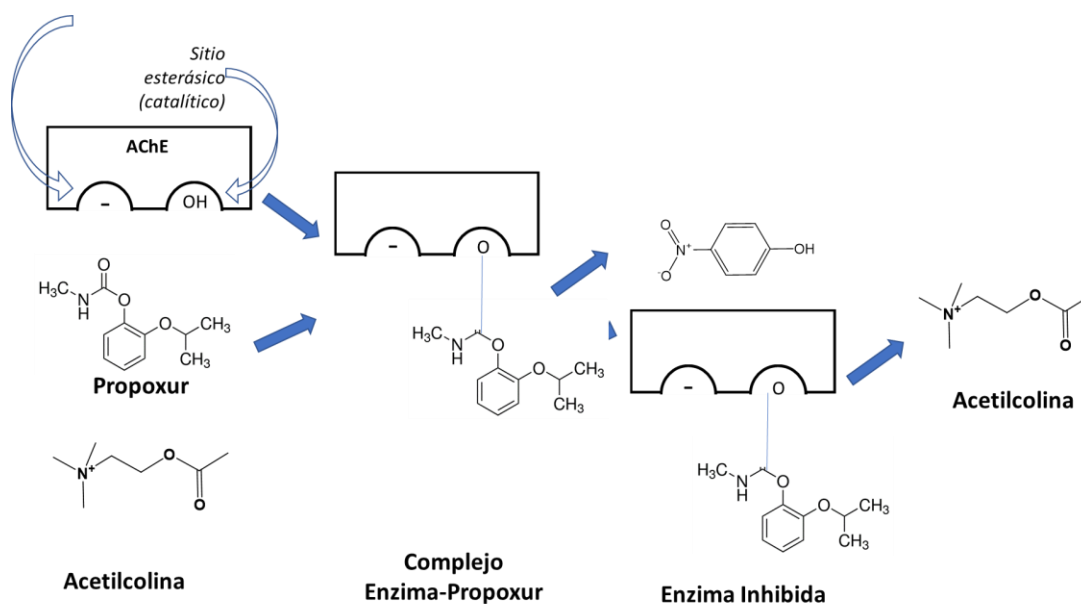


Figura 5.1. Representación gráfica del mecanismo de inhibición de la AChE en presencia del pesticida Propoxur.

5.2 DETERMINACIÓN ELECTROQUÍMICA DE LA PRESENCIA DE PROPOXUR EN EL SISTEMA BIO-ELECTROQUÍMICO.

Los estudios potenciométricos se llevaron a cabo con el electrodo ISE previamente construido y modificado con NPsAu acondicionado durante 15 minutos como electrodo de trabajo y un electrodo de referencia de Ag/AgCl_{sat} y utilizando una celda electroquímica en donde se colocó buffer de fosfatos pH7 a temperatura constante de 20°C y 400 rpm. Con el objetivo de observar a que concentración el pesticida deja de inhibir a la AChE se utilizaron cinco diferentes concentraciones de Propoxur, $1 \times 10^{-8} \text{M}$, $1 \times 10^{-12} \text{M}$, $1 \times 10^{-16} \text{M}$, 1×10^{-18} y $1 \times 10^{-20} \text{M}$, añadiendo una concentración fija de $1 \times 10^{-2} \text{M}$ de ACh. Como electrolito soporte se utilizó buffer de fosfatos pH 7 y para estudio se utilizaron diluciones de ACh a una concentración de 8×10^{-5} y AChE 0.4 unidades/ml.

Resultados.

La Figura 5.2 es una gráfica de potencial versus tiempo en la que se observa el aumento del potencial cuando se agrega ACh $1 \times 10^{-2} \text{ M}$, posteriormente se mezcla el pesticida con la enzima AChE 8 unidades/mL durante 10 minutos y se adicionan al sistema, para las concentraciones $1 \times 10^{-8} \text{ M}$ (en rojo), $1 \times 10^{-12} \text{ M}$ (en amarillo), y $1 \times 10^{-16} \text{ M}$ (en verde) no se observa una disminución del potencial transcurrido el tiempo, esto indica que la AChE se encuentra inhibida por completo por el pesticida, no obstante en la concentración $1 \times 10^{-16} \text{ M}$ se advierte que el potencial comienza a disminuir aunque la disminución evidente se da en la concentración de pesticida $1 \times 10^{-20} \text{ M}$ lo que demuestra que en este punto la AChE no se ve afectada por la presencia del pesticida.

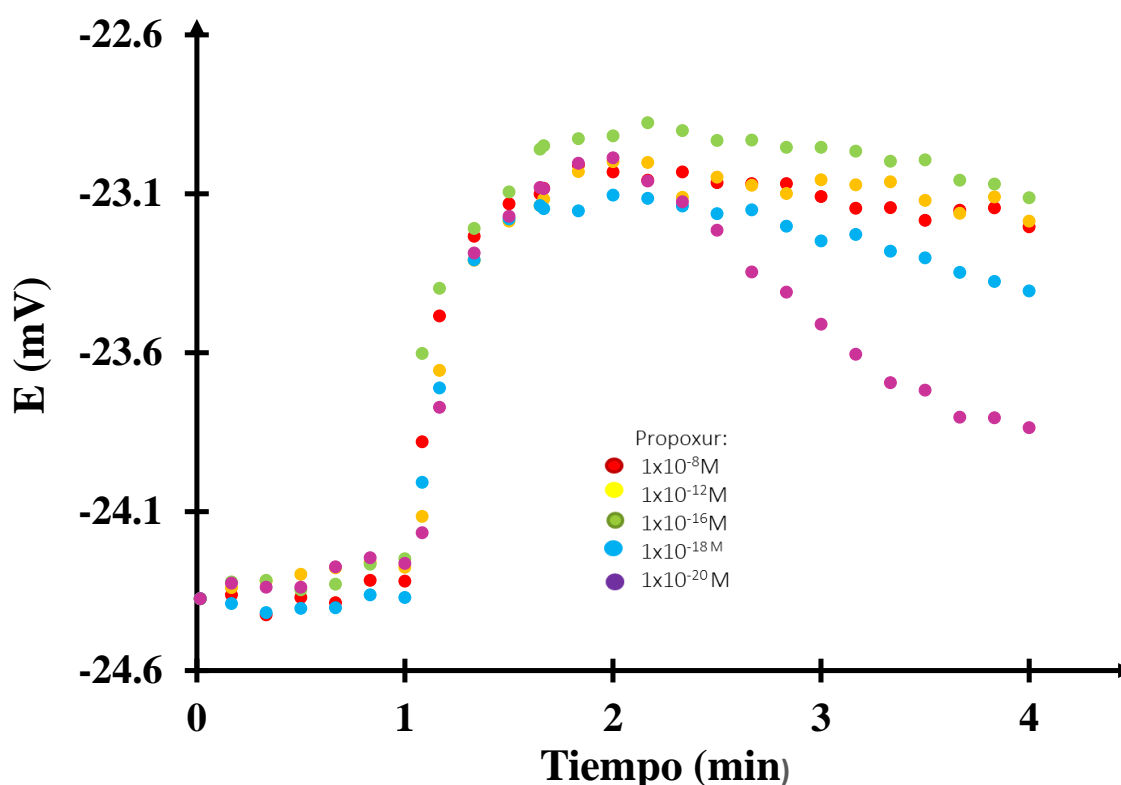


Figura 5.2. Gráfica de potencial versus tiempo donde se observa en verde la reacción de la AChE en presencia de la ACh y en azul la inhibición del Propoxur ante la AChE dentro del sistema bio-electroquímico.

Conclusiones.

Con base a los resultados obtenidos se puede afirmar que el electrodo ISE selectivo a iones de ACh construido en este trabajo y modificado con NPsAu puede detectar la presencia de pesticidas carbamatados como el Propoxur dentro de un sistema bio-electroquímico que contiene a la AChE en solución.

CONCLUSIONES GENERALES

Para la construcción de un ISE selectivo a acetilcolina, los plastificantes NPE y ADIPATO son selectivos para iones de ACh^+ y no presentan interferencia con los cationes H^+ , Na^+ , K^+ y Ch^+ . Además, se optimizó el porcentaje de los componentes de la membrana polimérica y del ionóforo, descubriendo que el porcentaje: matriz 33.2%, ionóforo 0.5% y plastificante 66.3% mejora la selectividad del electrodo

Una alternativa ante el uso de los electrodos serigrafiados son los electrodos tipo Composite, los cuales presentan un buen desempeño con la ventaja de que su superficie se renueva con facilidad. Además, se observó que las NPsAu mejoran la selectividad del electrodo ante la ACh, tanto en los electrodos serigrafiados como en los electrodos tipo composite.

Mediante el estudio del tiempo óptimo de acondicionado, se encontró que acondicionando el electrodo durante 15 minutos mantiene su reproducibilidad y mejora el límite de detección del mismo.

Finalmente se concluye que dentro de un sistema bio-electroquímico, en donde la enzima se encuentra en solución, es posible seguir la reacción de hidrólisis obteniendo una caída de potencial ante la AChE, gracias a esto, mediante la inhibición de la enzima, la determinación indirecta del pesticida propoxur es posible.

PERSPECTIVAS

A partir de los resultados y discusiones presentadas en la presente tesis, las perspectivas de trabajos futuros son las siguientes:

- Optimizar la respuesta del electrodo mediante cinética enzimática.
- Construir una curva de inhibición la cual permita ver el punto máximo de inhibición de la AChE.
- Mejorar los parámetros analíticos para la determinación del pesticida.
- Construir una curva de calibración para la determinación de Propuxur.
- Validar el método de determinación del pesticida.

ANEXOS

ANEXO 1.

POTENCIOMETRÍA.

Los métodos potenciométricos miden la diferencia de potencial que se da gracias a la interacción que existe entre el analito y un elemento de reconocimiento en condiciones de intensidad de corriente cero, siendo su objetivo determinar la concentración de los analitos a partir de los datos de potenciales de electrodo.

El objetivo de una medición potenciométrica es obtener información acerca de la concentración de una solución mediante el potencial que aparece entre dos electrodos. La medición del potencial de la celda se determina bajo condiciones reversibles en forma termodinámica y esto implica que se debe dejar pasar el tiempo suficiente para que la celda se equilibre y que sólo se podrá extraer una corriente insignificante en el transcurso de la determinación[49].

En la figura A.1 se observa una potenciometría a corriente nula llevada a cabo con un ISE en donde se puede observar que en el intervalo de tiempo que va de 0 a 600 segundos el electrodo no registra una diferencia de potencial ante al analito, sin embargo a partir de 600 segundos en adelante se observa como al aumentar la concentración del analito aumenta el potencial y este se estabiliza por un periodo de tiempo asegurando así que este aumento de potencial se debe a la concentración del analito en la solución y no a otros factores. La forma de escalera es típica de una potenciometría de un ISE en donde la interacción entre la membrana y el analito altera el potencial a través de la membrana

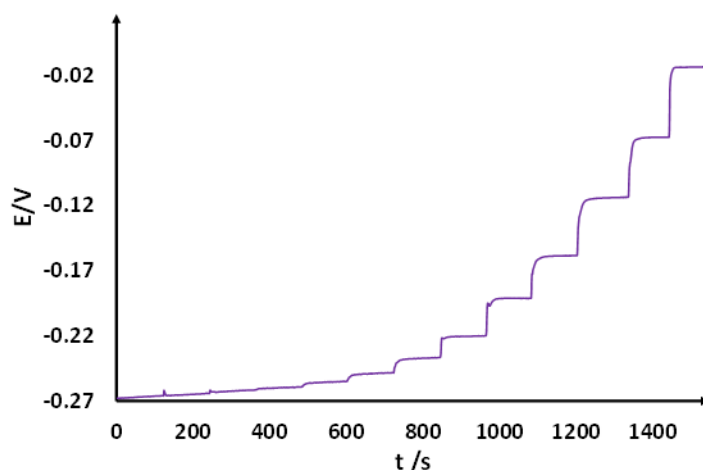


Figura A.1. Representación esquemática de la respuesta típica de una potenciometría de un ISE

SENSORES POTENCIOMÉTRICOS

EL principio de un sensor potenciométrico se basa en el fenómeno electroquímico, conocido como "pila de concentración", en donde se encuentran dos semiceldas idénticas unidas por un puente salino, existiendo una diferencia entre las actividades de los iones y presentando así una diferencia de potencial. En este aspecto, los electrodos selectivos a iones (ISE) utilizan una membrana permeable y selectiva como puente salino, comportándose como un compuesto portador de iones entre la solución interna de la membrana y la solución de la muestra a analizar. Las membranas de los ISE suelen estudiarse en condiciones de corriente nula, es decir se tiene:

Referencia externa | muestra || membrana || solución interna | referencia interna

Como resultado, el modelo de potencial de límite se puede utilizar para describir la respuesta de los ISE con mucha precisión, para lo cual se describe a continuación la contribución de los potenciales de límite.

POTENCIAL DE MEMBRANA

En el caso de los ISE, el potencial de difusión dentro de la membrana es cero si no se producen gradientes de concentración, por lo que se dice que muestran una respuesta Nernstiana. Por simplicidad, los potenciales de difusión interna se tratan como efectos secundarios, y, por lo tanto:

$$E_M = E_{const} + E_{PB} \quad (1)$$

Donde E_{PB} es el potencial límite en la interfase membrana/muestra, que se puede derivar de consideraciones termodinámicas básicas, suponiendo que los procesos de transferencia de iones y de complejación son relativamente rápidos

A partir de esta ecuación y con las condiciones de que $a_{i(org)}$ sea constante y las demás contribuciones independientes, se puede reducir a la ecuación de Nernst:

$$E_M = E^0 + \frac{RT}{ZF} \ln a_{i(aq)} \quad (2)$$

De acuerdo con la ecuación 3.4, la composición de la superficie de la membrana que se encuentra en la muestra debe ser constante con el objetivo de obtener una respuesta Nernstiana para el ISE[12].

- La membrana debe ser lo suficientemente hidrofóbica para no permitir demasiada coextracción de contraiones de acuerdo con el equilibrio.
- Si se producen reacciones de intercambio iónico con iones interferentes de la misma carga, la actividad $a_{i(org)}$ del ion primario no complejo se reduce en la ecuación 3.5 y se espera una respuesta sub-Nernstiana.
- El ionóforo no debe unirse al ion primario con demasiada fuerza.
- No deben estar presentes en la muestra otras especies (eléctricamente neutras) interferentes que se puedan extraer a la membrana y alterar la actividad $a_{i(org)}$.

Teniendo esto en mente, se puede afirmar que las membranas poseen sitios iónicos, los cuales pueden ser “fijos” incorporados para las membranas, construidas con poliestireno reticulado sulfonado, o sitios iónicos “móviles” atrapados hidrofóbicamente intencionalmente para las membranas construidas con PVC[36]. Es por esto, que un estudio de los componentes de la membrana, principalmente los plastificantes, se llevó a cabo en este trabajo utilizando una membrana polimérica de matriz de PVC. A continuación, se explica a detalle el funcionamiento de los componentes de la misma.

ANEXO 2.

TIPOS DE ELECTRODOS

El desarrollo de sensores ha sido de gran importancia para la humanidad ya que estos se han aplicado en campos como: control de procesos, control de calidad, seguridad, diagnósticos clínicos, etcétera, resultando en dispositivos de fácil uso. En este sentido, los denominados sensores electroquímicos responden a una clasificación en tres grandes grupos; en primer lugar tenemos a los sensores potenciométricos, especialmente los electrodos selectivos a iones (ISE), después los transistores de efecto de campo sensible a iones más conocidos como ISFET donde el origen de la señal también es potenciométrico y finalmente los sensores amperométricos en su forma de electrodos modificados químicamente. Entre estos sensores se encuentran los electroquímicos, en los cuales se utiliza un electrodo como elemento transductor obteniendo como salida una señal eléctrica, son dispositivos fácilmente miniaturizables, lo que permite poder medir muestras en volúmenes o áreas pequeñas; además, la modificación de las superficies electroactivas de estos dispositivos con materiales biológicos de reconocimiento molecular son conocidos como biosensores, dentro del progreso de los sensores electroquímicos estos constituyen un área avanzada. En la actualidad, se han dedicado grandes esfuerzo al desarrollo de sensores, ya que estos pueden aplicarse en diversos campos como: la higiene industrial, el control de procesos, el control de calidad, los diagnósticos

clínicos, la calidad del agua y del aire, la seguridad, las alarmas de seguridad en las casas, los controles remotos. Estas aplicaciones resultan económicas y conllevan beneficios sociales [44]. Entre la gran variedad de sensores químicos se encuentran los sensores electroquímicos, SE, en los cuales se usa un electrodo como elemento de reconocimiento y transductor, es por ello que estos dispositivos ocupan una posición líder entre los sensores disponibles en el mercado de la instrumentación analítica [35].

ELECTRODOS SERIGRAFIADOS

En particular los electrodos serigrafiados o también conocidos como Screen Printed se han popularizado como herramienta de análisis debido a su tamaño y fácil producción. Un electrodo serigrafiado es una pequeña tarjeta donde se encuentra un circuito eléctrico integrado que consiste en los electrodos en sí, junto a contactos eléctricos para su conexión al sistema de medida. Los primeros trabajos con electrodos serigrafiados aparecieron en la década de los 90, por lo que es una tecnología relativamente moderna. En la actualidad se aplican para el análisis en ámbitos tan variados como el industrial, medioambiental, agroalimentario y farmacéutico.

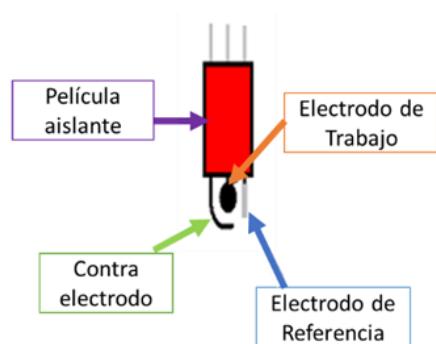


Figura A.2. Esquema de la composición de un electrodo Screen-Printed.

En la figura A2 se ve una representación gráfica de un electrodo serigrafiado y sus componentes, el electrodo de trabajo es de forma circular y tiene un diámetro de 4mm. El electrodo auxiliar es una línea curva de 16mm × 1.5mm, este electrodo rodea al electrodo de trabajo. El electrodo de referencia es un rectángulo de 5mm × 1.5mm.

ELECTRODOS TIPO COMPOSITE

Estos electrodos se definen como un material que contiene al menos una fase conductora con una fase aislante. Estos electrodos presentan diversas ventajas como que pueden ser fabricados con diferente forma o tamaño, permitiendo una fácil adaptación a una amplia variedad de configuraciones de electrodos, además de la versatilidad que se tiene con estos electrodos en la selectividad y sensibilidad al poder incorporar dentro del electrodo, diferentes modificadores de la matriz del composite.

En este trabajo nos enfocamos a los electrodos tipo composite de carbón, sus componentes son polvo de grafito, resina epóxica y endurecedor como se muestra en la figura A3.

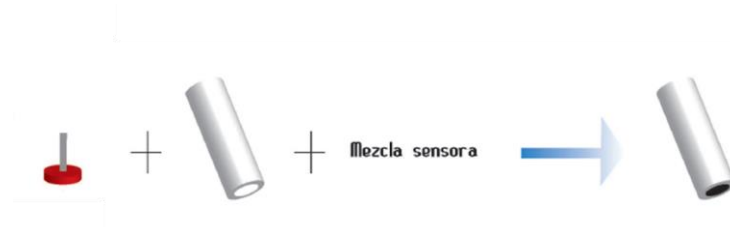


Figura A.3. Esquema de la construcción de un electrodo tipo composite.

Las resinas epóxicas se utilizan en este tipo de electrodos ya que aceptan la incorporación de otras especies químicas como metales, agentes quelantes y componentes biológicos como enzimas.

Por otro lado, los agentes endurecedores o de curado se utilizan, como su nombre lo indica, para formar radicales y que se lleve a cabo el proceso de curado. Dependiendo del tipo de resina es el tipo de endurecedor que se va a utilizar[50].

REFERENCIAS

- [1] M. Stoytcheva, *Pesticides, The Impacts of Pesticide Exposure*. 2011.
- [2] K. Kim, E. Kabir, and S. Ara, "Science of the Total Environment Exposure to pesticides and the associated human health effects," *Sci. Total Environ.*, vol. 575, pp. 525–535, 2017.
- [3] FAO, "International code of conduct on the distribution and use of pesticides," *Food Agric. Organ. United Nations*, pp. 1–36, 2003.
- [4] J. R. James R. Roberts, "Recognition and management of Pesticide Poisoning," *United States Environ. Prot. Agency Off. Presticide Programs*, vol. 54, 2013.
- [5] Y. Kim, J. Ahn, S. Moon, and J. Lee, "Biodegradation and detoxification of organophosphate insecticide , malathion by *Fusarium oxysporum* f . sp . pisi cutinase," vol. 60, pp. 1349–1355, 2005.
- [6] J. Estévez, V. Selva, M. Benabent, I. Mangas, M. Á. Sogorb, and E. Vilanova, "Acetylcholine-hydrolyzing activities in soluble brain fraction: Characterization with reversible and irreversible inhibitors," *Chem. Biol. Interact.*, pp. 4–11, 2016.
- [7] E. Silva, L. Morales, and J. E. Ortiz, "Epidemiological evaluation of acetylcholinesterase inhibitors pesticides in Colombia, 1996-1997," *Biomédica*, vol. 20, no. C, pp. 200–9, 2000.
- [8] World Health Organization, "The Who Recommended Classification of Pesticides By Hazard and Guidelines To Classification 2009," *World Heal. Organ.*, pp. 1–60, 2010.
- [9] J. A. Lacasaña, "Plaguicidas : clasificación , uso , toxicología y medición de la exposición," vol. 4, no. 2, pp. 67–75, 2001.
- [10] W. R. Everett and G. A. Rechnitz, "Enzyme-based electrochemical biosensors for determination of organophosphorous and carbamate pesticides," *Anal. Lett.*, vol. 32, no. 1, pp. 1–10, 1999.
- [11] G. Valdés-Ramírez, D. Fournier, M. T. Ramírez-Silva, and J. L. Marty, "Sensitive amperometric biosensor for dichlorovos quantification: Application to detection of residues on apple skin," *Talanta*, vol. 74, no. 4, pp. 741–746, 2008.
- [12] E. Bakker, P. Bühlmann, and E. Pretsch, "Carrier based ion-selective electrodes and bulk optodes. 1. General characteristics," *Chem. Rev.*, vol. 97, no. 8, pp. 3083–3132, 1997.
- [13] J. Juárez-Gómez, M. T. Ramírez-Silva, M. Romero-Romo, E. Rodríguez-Sevilla, F. Pérez-García, and M. Palomar-Pardavé, "Ion-Selective Electrodes for Mercury Determination at Low Concentrations: Construction, Optimization and Application," *J. Electrochem. Soc.*, vol. 163, no. 3, pp. B90–B96, 2016.
- [14] P. Bühlmann, E. Pretsch, and E. Bakker, "Carrier-Based Ion-Selective Electrodes and Bulk Optodes. 2. Ionophores for Potentiometric and Optical Sensors," *Chem. Rev.*, vol. 2665, 1998.
- [15] M. Cuartero, J. A. Ortuño, M. S. García, and F. García-Cánovas, "Assay of acetylcholinesterase activity by potentiometric monitoring of acetylcholine," *Anal. Biochem.*, vol. 421, no. 1, pp. 208–212, 2012.
- [16] S. Firdoz, F. Ma, X. Yue, Z. Dai, A. Kumar, and B. Jiang, "A novel amperometric biosensor based on single walled carbon nanotubes with acetylcholine esterase for the detection of carbaryl pesticide in water," *Talanta*, vol. 83, no. 1, pp. 269–273, 2010.
- [17] A. Amine, F. Arduini, D. Moscone, and G. Palleschi, "Recent advances in biosensors based

- on enzyme inhibition," *Biosens. Bioelectron.*, vol. 76, pp. 180–194, 2016.
- [18] M. Pumera, S. Sánchez, I. Ichinose, and J. Tang, "Electrochemical nanobiosensors," *Sensors Actuators, B Chem.*, vol. 123, no. 2, pp. 1195–1205, 2007.
 - [19] M. Eddleston, "Pesticides," pp. 193–196, 2015.
 - [20] J. Ortega-Ceseña, F. Espinosa-Torres, and L. López-Carrillo, "El control de los riesgos para la salud generados por los plaguicidas organofosforados en México: retos ante el Tratado de Libre Comercio," *Salud Publica de Mexico*, vol. 36, no. 6, pp. 624–632, 1994.
 - [21] E. A. Songa and J. O. Okonkwo, "Recent approaches to improving selectivity and sensitivity of enzyme-based biosensors for organophosphorus pesticides: A review," *Talanta*, vol. 155, pp. 289–304, 2016.
 - [22] Cicoplafest, "Catalogo de plaguicidas," *Com. Fed. para la protección contra riesgos Sanit.*, p. 481, 2016.
 - [23] A. J. Bard and L. R. Faulkner, *Fundamentals and Fundamentals and Applications*, vol. 8, no. c, 2015.
 - [24] J. S. Van Dyk and B. Pletschke, "Review on the use of enzymes for the detection of organochlorine, organophosphate and carbamate pesticides in the environment," *Chemosphere*, vol. 82, no. 3, pp. 291–307, 2011.
 - [25] P. Skládal, "Detection of organophosphate and carbamate pesticides using disposable biosensors based on chemically modified electrodes and immobilized cholinesterase," *Anal. Chim. Acta*, vol. 269, no. 2, pp. 281–287, 1992.
 - [26] D. Barcelo, S. Lacorte, and J. Marty, "Validation of an enzymatic biosensor with liquid chromatography for pesticide monitoring," *Trends Anal. Chem.*, vol. 14, no. 7, pp. 334–340, 1995.
 - [27] E. Rodríguez-Sevilla, M. Palomar-Pardavé, M. Romero-Romo, and M. T. Ramírez-Silva, "Modulating the analytical performance of an electrochemical biosensor through varying, at the working electrode, the surface area ratio between that covered by the enzyme and the enzyme-free one," *Anal. Methods*, vol. 7, no. 20, pp. 8568–8571, 2015.
 - [28] G. Alarcón-Angeles, B. Pérez-López, M. Palomar-Pardave, M. T. Ramírez-Silva, S. Alegret, and A. Merkoçi, "Enhanced host-guest electrochemical recognition of dopamine using cyclodextrin in the presence of carbon nanotubes," *Carbon N. Y.*, vol. 46, no. 6, pp. 898–906, 2008.
 - [29] J. Aldana-González, M. Palomar-Pardavé, S. Corona-Avedaño, M. G. Montes De Oca, M. T. Ramírez-Silva, and M. Romero-Romo, "Gold nanoparticles modified-ITO electrode for the selective electrochemical quantification of dopamine in the presence of uric and ascorbic acids," *J. Electroanal. Chem.*, vol. 706, pp. 69–75, 2013.
 - [30] J. Aldana-González, J. Olvera-García, M. G. Montes De Oca, M. Romero-Romo, M. T. Ramírez-Silva, and M. Palomar-Pardavé, "Electrochemical quantification of the electroactive surface area of Au nanoparticles supported onto an ITO electrode by means of Cu upd," *Electrochem. commun.*, vol. 56, pp. 70–74, 2015.
 - [31] S. Kurbanoglu, S. A. Ozkan, and A. Merkoçi, "Nanomaterials-Based Enzyme Electrochemical Biosensors Operating Through Inhibition for Biosensing Applications," *Biosens. Bioelectron.*, no. September, pp. 1–13, 2016.
 - [32] R. a Copeland and a J. Wiley, *ENZYMES A Practical Introduction*, vol. 7, no. 2, 2000.
 - [33] C. K. Mathews and K. G. Ahern, *Bioquímica*, Third Edit. 2002.
 - [34] H. Dvir, I. Silman, M. Harel, T. L. Rosenberry, and J. L. Sussman, "Acetylcholinesterase:

- From 3D Structure to Function," *Chem. Biol. Interact.*, vol. 187, no. 1–3, pp. 10–22, 2010.
- [35] A. Shatkey, "Individual Activity of Calcium Ions in Pure Solutions of CaCl_2 and in Mixtures," *Biophys. J.*, vol. 8, no. 8, pp. 912–919, 1968.
- [36] E. Lindner and Y. Umezawa, "Performance evaluation criteria for preparation and measurement of macro- and microfabricated ion-selective electrodes (IUPAC Technical Report)," *Pure Appl. Chem.*, vol. 80, no. 1, pp. 85–104, 2008.
- [37] J. J. Roy, "Development of Cross-Linked Enzyme Crystals As Robust Biocatalysts in Organic Media," no. December, 2004.
- [38] R. Bala, M. Kumar, K. Bansal, R. K. Sharma, and N. Wangoo, "Ultrasensitive aptamer biosensor for malathion detection based on cationic polymer and gold nanoparticles," *Biosens. Bioelectron.*, vol. 85, pp. 445–449, 2016.
- [39] P. H. J. Turkevich, John; Cooper, "A study of the nucleation and growth process in the synthesis of colloidal gold," *Discuss. Faraday Soc.*, vol. 55, no. c, pp. 55–75, 1951.
- [40] J. Turkevich, P. C. Stevenson, and J. Hillier, "The formation of colloidal gold," *J. Phys. Chem.*, vol. 57, pp. 670–673, 1953.
- [41] G. A. Álvarez-Romero, E. Garfías-García, M. T. Ramírez-Silva, C. Galán-Vidal, M. Romero-Romo, and M. Palomar-Pardavé, "Electrochemical and AFM characterization of the electropolymerization of pyrrole over a graphite-epoxy resin solid composite electrode, in the presence of different anions," *Appl. Surf. Sci.*, vol. 252, no. 16, pp. 5783–5792, 2006.
- [42] A. P. Periasamy, Y. Umasankar, and S. M. Chen, "Nanomaterials - Acetylcholinesterase enzyme matrices for organophosphorus pesticides electrochemical sensors: A review," *Sensors*, vol. 9, no. 6, pp. 4034–4055, 2009.
- [43] "http://www3.uah.es/bioquimica. Toxicidad de organofosforados y carbamatos.," vol. 1, pp. 1–5, 2010.
- [44] J. Reedijk, "Bioinorganic Catalysis," pp. 23–32.
- [45] Ž. Bajzer and E. E. Strehler, "About and beyond the henri-michaelis-menten rate equation for single-substrate enzyme kinetics," *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, vol. 417, no. 3, pp. 982–985, 2012.
- [46] A. Cornish-Bowden, "One hundred years of Michaelis–Menten kinetics," *Perspect. Sci.*, vol. 4, pp. 3–9, 2015.
- [47] J. Pallares and J. A. Ferré, "A simple model to predict mass transfer rates and kinetics of biochemical and biomedical Michaelis-Menten surface reactions," *Int. J. Heat Mass Transf.*, vol. 80, pp. 192–198, 2015.
- [48] R. M. F. Bezerra, P. A. Pinto, I. Fraga, and A. A. Dias, "Enzyme inhibition studies by integrated Michaelis-Menten equation considering simultaneous presence of two inhibitors when one of them is a reaction product," *Comput. Methods Programs Biomed.*, vol. 125, pp. 2–7, 2016.
- [49] A. Alegret, S. Merkoci, "Electrochemical Sensor Analysis. Contributors to Volume 49," .
- [50] M. T. Ramirez-Silva, "Universidad Autónoma Metropolitana-Iztapalapa División De Ciencias Básicas E Ingeniería," 1996.